

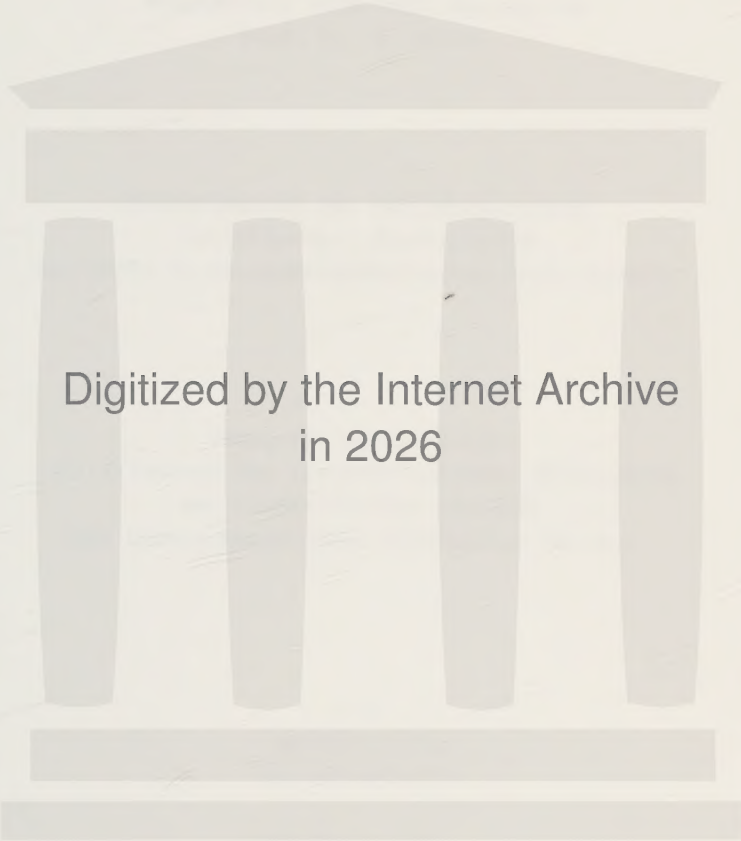
Untersuchungen zur Antikörperantwort
verschiedener Hühnerlinien mit Hilfe
eines haptenspezifischen Elisa-Systems

Manuela Trüby

Disbui. München

1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554816_0100

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. U. Lösch

Untersuchungen zur Antikörperantwort
verschiedener Hühnerlinien
mit Hilfe eines haptenspezifischen Elisa-Systems

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Manuela Trüby
aus Rheinfelden

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: -----Prof. Dr. H. Zucker-----

Referent: -----Prof. Dr. U. Lösch-----

Korreferent: -----Prof. Dr. H. Mahnel-----

Tag der Promotion: -----27. Februar 1987-----

Meinen Eltern

INHALT

	Seite
1. Einleitung und Literatur	1
2. Material und Methoden	7
2.1 Versuchstiere	7
2.1.1 Verwendete Hühnerlinien	7
2.1.2 Alter und Haltung der Tiere	7
2.2 Reagentien und Chemikalien	7
2.3 Immunogene	8
2.3.1 Kopplung von DNP an HSA	8
2.3.2 Kopplung von DNP an Hämocyanin	8
2.3.3 Kopplung von DNP an bovines Gammaglobulin	9
2.3.4 Kopplung von DNP an Polylysin	9
2.3.5 Verwendung der Hapten-Carrier-Komplexe	9
2.4 Immunmodulatoren	9
2.5 Immunisierung, Bezeichnung der Versuchsgruppen und Serumgewinnung	10
2.5.1 DNP - Standard	10
2.5.2 DNP I	10
2.5.3 DNP II	11
2.5.4 DNP III	11
2.5.5 Serumgewinnung	12
2.6 Reinigung der Antikörper für die Elisa- Standards	12
2.6.1 Affinitätschromatographie an Sepharose 4B	12
2.6.2 Bestimmung der Immunglobulinkonzentrationen	12
2.7 Entwicklung eines isotypspezifischen Elisa -Systems	13
2.7.1 Lösungen und Puffer	13
2.7.2 Herstellung von Antikörper-Enzym-Konjugaten	13
2.7.3 Durchführung des haptenspezifischen Elisa	13
2.7.4 Indirekter kompetitiver haptenspezifischer Elisa	15

	Seite
2.8	Statistische Auswertung 17
3.	Ergebnisse 18
3.1	Kopplung von DNP an Trägerprotein 18
3.2	Indirekter nichtkompetitiver Elisa 18
3.3	Indirekter kompetitiver Elisa 22
3.4	Anti-DNP Antikörperkonzentrationen nach Behandlung mit DNP-Trägerprotein und an- schließender LPS - Applikation 27
3.4.1	DNP II - HSA 27
3.4.2	DNP II - Hämocyanin 1 32
3.4.3	DNP II - Hämocyanin 2 35
3.5	Anti-DNP Antikörperkonzentrationen nach Vor- immunisierung mit Trägerprotein und anschließender Behandlung mit DNP - Trägerprotein 38
3.5.1	DNP II - HSA 38
3.5.2	DNP II - Hämocyanin 1 42
3.5.3	DNP II - Hämocyanin 2 45
3.6	Anti-DNP Antikörperkonzentrationen nach Vorimmunisierung mit Trägerprotein und an- schließender Behandlung mit DNP - Carrier bei gleichzeitiger Verabreichung von Levamisol 48
3.6.1	DNP III - HSA, DNP III - Häm 1 und DNP III - Häm 2 48
3.7	Statistische Auswertung 48
3.8	Indirekter Elisa zum Nachweis der carrier- spezifischen Antikörper 52
4.	Diskussion 53
4.1	Besprechung der Methoden 53
4.2	Besprechung der Ergebnisse 55
5.	Zusammenfassung 61
6.	Summary 62
7.	Tabellarischer Anhang 63
8.	Literaturverzeichnis 87

1. Einleitung und Literatur

Ein funktionierendes Immunsystem spielt eine lebenswichtige Rolle bei der Auseinandersetzung des Organismus mit seiner Umwelt. Wirbeltiere können - dank ihres Immunsystems - eingedrungene körperfremde Stoffe erkennen und eine bemerkenswert spezifische Abwehrreaktion dagegen einleiten. Dies zeigt sich vor allem bei einer neuerlichen Konfrontation mit solchen Antigenen.

Entscheidend für das Auslösen einer Immunantwort ist, die chemischen Marker zu erkennen, in denen sich "Selbst" von "Nichtselbst" unterscheidet.

In der Natur sind mannigfaltige Immundefekte, d.h. angeborene oder erworbene Unfähigkeiten, auf einen immunogenen Reiz mit einer vollausgeprägten Immunantwort zu reagieren, bekannt.

In diesem Zusammenhang häufig auftretende Erkrankungen beim Menschen sind die "common variable hypogammaglobulinemia" (cvh) (11,84,93,94), isotypspezifische Immundefizite (5,84), x-gebundene infantile Agammaglobulinämie mit Thymoma (84,88).

Es bleibt unklar, ob eine gestörte immunregulatorische T-Zell-Funktion den primären Faktor in der Pathogenese dieser Krankheit darstellt, oder ob sie eine sekundäre Entwicklung ist, verknüpft mit einem primären intrinsischen Defekt in der Reifung der Plasmazellen (15).

Das Auftreten derartiger Immundefekte ist auch im Tierreich bekannt.

Seit 1965 wird am hiesigen Institut eine, zunächst spontan aufgetretene Dysgammaglobulinämie des Haushuhns untersucht, wobei es durch gezielte Weiterzüchtung gelang, eine seit 1977 bezüglich des Haupthistokompatibilitätslocus homozygote Linie (B19) heranzuzüchten (33), die seither als UM-B19 Hühnerlinie (UM steht für Universität München) bezeichnet wird.

Diese UM-B19 Hühnerlinie ist durch verschiedene immunbiologische Anomalien gekennzeichnet: hochgradiger Serum-IgG-Mangel bei stark erhöhtem IgM-Spiegel, Unfähigkeit zur IgG-Antikörpersynthese, Verminderung lymphozytärer Oberflächenimmunglobuline, Dysregulation der Allergie vom verzögerten Typ und eine Erhöhung der Serum-IgA-Konzentration (57).

Nach dem Serumimmunglobulinmuster unterscheidet man zwischen:

- a) permanent dysgammaglobulinämischen Hühnern mit stark erniedrigten, zum Teil nicht meßbaren IgG-Konzentrationen bei erhöhten IgM- und IgA-Konzentrationen.
- b) normogammaglobulinämischen Hühnern mit der Norm entsprechenden Konzentrationen an IgG und IgM und leicht erhöhten IgA-Konzentrationen.
- c) transitorisch dysgammaglobulinämischen Hühnern, bei denen meist gleichzeitig mit der sexuellen Reife wieder eine Verschiebung zu normalen IgG-Werten auftritt.

Die von Benedict et al. beschriebene UCD 140-Hühnerlinie zeigt ein ähnliches dysgammaglobulinämisches Erscheinungsbild (8,9), das durch einen selektiven 7S-Ig-Mangel bei erhöhten IgM-Spiegeln und der Norm entsprechenden bzw. geringgradig erhöhten Serum-IgA-Konzentrationen charakterisiert wird.

Es wurde eine IgG-spezifische T-Suppressoraktivität (15) und eine Abweichung in der Bursaentwicklung (15,29) nachgewiesen. Als mögliche Ursache für diesen Immundefekt der UCD-140 Hühner betrachten Benedict et al. eine genetisch oder viral induzierte Bursadegeneration, sowie eine erhöhte T-Zell-Suppressor oder verringerte T-Zell-Helfer-Aktivität.

Bei den UM-B19 Hühnern wurden im Vergleich dazu nur geringe histologische Abweichungen (Vakuolisierung) in der Bursaentwicklung vorgefunden (56).

Es wird angenommen, daß die Dysgammaglobulinämie der UM-B19 Hühner ätiologisch aus einer verzögerten Bursaentwicklung

resultieren kann: ähnlich wie bei einer Toleranzinduktion werden während der Neonatalperiode unreife B_G-Zellen durch Antigene der Umgebung entfernt.

Dieses Ereignis soll Suppressormechanismen induzieren und das B-Zell-Subpopulationsmuster umbilden (49); dabei ist aus Bursektomieexperimenten bekannt, daß eine Beschränkung der B-Zell-Population eine isotypspezifische T-Suppression induzieren kann (15).

Der Vererbungsgang von Dys- und Normogammaglobulinämie ist bis heute jedoch undurchsichtig geblieben.

Um zu einer weiteren Charakterisierung der Dysgammaglobulinämie zu gelangen, wurde mit sogenannten Immunmodulatoren experimentell in die Entwicklungsabläufe der B- und T-Zelllinien eingegriffen.

Lösch et al. (57) untersuchten die humorale Immunantwort dysgammaglobulinämischer UM-B19 Hühner gegenüber einem thymusabhängigen (Humanserumalbumin = HSA) bzw. thymusunabhängigen (Brucella abortus) Antigen.

Es kam gegenüber dem T-abhängigen Antigen HSA ausschließlich zur Bildung von Antikörpern der IgM-Klasse, während Kontrollhühner hierauf mit einer hohen IgG-Antikörperantwort reagierten. Im Gegensatz dazu traten als Folge der Immunisierung mit dem T-zellunabhängigen Antigen B. abortus bei den dysgammaglobulinämischen Tieren neben Antikörpern der IgM-auch Antikörper der IgA-Klasse auf (57).

Aus diesen Ergebnissen, nämlich einer reinen IgM-, d.h. T-Zell-unabhängigen Antikörperantwort gegenüber HSA bzw. einer den Kontrolltieren vergleichbaren Antikörperantwort auf die Immunisierung mit dem T-Zell-unabhängigen Antigen B. abortus, wurde auf das Vorliegen einer T-Zell-Helfer-Funktionsstörung bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern geschlossen (57).



Bei Modifizierung des Immunisierungsschemas durch gleichzeitige Verabreichung von FCA, dessen primäre Wirkungsweise in einer Stimulation von T-Helfer-Funktionen zu liegen scheint, wie dies unter anderem von Tam und Benedict (92) beim Huhn, von Allison und Davies (3) sowie von Del Guercio (21) bei der Maus beschrieben wird, führt bei den Hühnern der UM-B19 Linie zu einer verstärkten Synthese von IgM- und IgA-Antikörpern gegen ein gleichzeitig verabreichtes Antigen. Die Serum-IgM-Immunglobulinspiegel werden mit und ohne Antigen stark erhöht (34,48,57); die Serum-IgG-Level bleiben unverändert (34).

Von Lipopolysaccharid (LPS) aus der Zellwand gramnegativer Bakterien ist bekannt, daß die B-Zellen sowohl bei Säugern (4,58) als auch bei Hühnern (38) stimuliert werden.

LPS von Salmonella minnesota R 595, das sehr reich an Lipid A ist, stimuliert die Synthese bei immunologisch normalen Mäusen und thymuslosen Nacktmäusen (40). Die Fähigkeit dysgammaglobulinämischer Hühner nach LPS-Behandlung IgG bzw. IgG-Antikörper gegen das gleichzeitig verabreichte Antigen HSA zu synthetisieren, zeigen die Ergebnisse von Kühlmann-Rabens et al.(49). LPS kann offensichtlich normalerweise nicht reagierende B_G-Zellen stimulieren.

Als weiterer Immunmodulator wird häufig Levamisol, das links-drehende Enantiomer von Tetramisol eingesetzt. Für diese, ursprünglich als Anthelmintikum entwickelte Substanz, ist eine thymosinähnliche Wirkung nachgewiesen (35,75,89).

Levamisol soll als thymomimetisches Agens einen regulatorischen Einfluß bei gestörten T-Helfer-T-Suppressor Verhältnissen besitzen und dysgammaglobulinämische Tiere zur vorübergehenden IgG-Synthese befähigen (49). Spezielle Antikörperantworten sowohl gegen T-unabhängige als auch gegen T-abhängige Antigene sind quantitativ nicht eingeschränkt,

jedoch auf die Synthese von IgM- und IgA-Isotypen beschränkt (49).

Bisher kamen bei der Untersuchung der UM-B19 Hühnerlinie T-Zell-abhängige und T-Zell-unabhängige Vollantigene (HSA bzw. B. abortus) zur Anwendung, d. h. hochmolekulare organische Verbindungen, die einerseits in der Lage sind, im Wirbeltierorganismus eine Antikörperbildung anzuregen, und zum anderen die Fähigkeit haben, mit den gebildeten Antikörpern spezifisch zu reagieren.

Neben den Vollantigenen gibt es niedermolekulare organische Verbindungen, wie z.B. Dinitrophenol, die nicht zur Antikörperbildung, wohl aber zur Antikörperbindung fähig sind.

Man bezeichnet diese Verbindungen als Halbantigene bzw. Haptene. Derartige Haptene erlangen die Eigenschaft von Vollantigenen, wenn man sie an hochmolekulare Trägerproteine koppelt. Die gekoppelten Haptene wirken dann an diesem Träger als eine immunogen determinante Gruppe.

Proteingebundene Haptene sind klassische Beispiele für T-Zell-abhängige Antigene (43,63,74) wobei Symons et al.(91) feststellten, daß die Wahl des Proteinträgers nur eine geringe Wirkung auf die DNP-Antwort zeigt.

Die Verwendung von DNP, welches von Landsteiner erstmals an Proteinträger gekoppelt wurde (51), ist in der immunologischen Forschung weit verbreitet, da es sich gut eignet, die T-Zell-B-Zell-Kooperation (2,30,69,90), den Einfluß T-Zell-abhängiger und T-Zell-unabhängiger Proteinträger auf immunkompetente Zellen (2,90) und die Auswirkung der Anzahl der antigenen Determinanten auf Antikörperbildung und -affinität (41,72,90) zu untersuchen. Außerdem sind Haptene weit verbreitet bei der Untersuchung der Mechanismen der Toleranzinduktion (3,47,65,86).

Zielsetzung:

Das Ziel dieser Arbeit ist es, Einblick in Wesen und mögliche Ursachen der Dysgammaglobulinämie des Huhnes zu gewinnen, indem die Immunantwort auf ein Hapten (DNP) untersucht werden soll. Dabei sollen unter anderem FCA als Adjuvans, LPS als Mitogen und Levamisol als Immunmodulator verwendet werden.

Zur Bestimmung des isotypspezifischen Antikörpertiter soll ein haptenspezifischer Elisa entwickelt werden.

Die erhaltenen Ergebnisse sollen in die bisher bekannten Erkenntnisse eingeordnet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

2.1.1 Als Versuchstiere dienten folgende Hühnerlinien:
Dysgammaglobulinämische Hühner der Linie UM-B19 beiderlei Geschlechts mit verändertem Serumimmunglobulinmuster, sowie immunbiologisch intakte, nicht B-typisierte Heisdorf-Nelson-Lohmann (HNL)-Leghornhühner beiderlei Geschlechts als Kontrolltiere.

2.1.2 Alter und Haltung der Tiere

Das Alter betrug bei Versuchsbeginn in der Regel über 3 Monate.

Handelsübliches pelletiertes Junghennenalleinfutter und Wasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Die Haltung erfolgte auf Gitterrosten.

2.2 Reagentien und Chemikalien

- alkalische Phosphatase
Fa. Boehringer, Mannheim
- AMP (2-Amino-2-methyl-1-propanol)-Puffer
Fa. Sigma, St. Louis, U.S.A.
- FCA (Freund's complete Adjuvant)
Fa. Difco, Detroit, U.S.A.
- Levamisol und LPS (Lipopolysaccharid)
Fa. Calbiochem - Fa. Behring, La Jolla, U.S.A.
- p- Nitrophenylphosphat
Fa. Serva, Heidelberg

die übrigen Chemikalien wurden von der Fa. Merck, Darmstadt bezogen.

2.3 Immunogene

Kopplung des Haptens Dinitrophenyl (DNP) an Trägerproteine:
Zur Herstellung unterschiedlicher Hapten-Proteinkomplexe wurde 2,4 Dinitrobenzensulfonat als Kochsalz (Eastman Organic Chemistry, Rochester, N.Y.) nach der Methode von Eisen (23) an verschiedene Trägerproteine gekoppelt.

Als Carrier wurden humanes Serumalbumin (HSA), bovinen Gammaglobulin Fraktion 5 (BGG) und Polylysin (Molekulargewicht 55000) der Fa. Sigma, St. Louis USA sowie Hämocyanin aus *Helix pomatia* der Fa. Serva, Heidelberg verwendet.

2.3.1 Kopplung von DNP an HSA

1000 mg HSA und 1000 mg Kalium-Carbonat (K_2CO_3) wurden in 50 ml Aqua bidest gelöst.

Daraufhin wurden 500 mg 2,4 Dinitrobenzensulfonat - Na - Salz zugegeben.

Die Inkubation wurde 24 h bei 30°C im Schüttelwasserbad durchgeführt. Nach zweitägiger exzessiver Dialyse gegen Aqua bidest war das Dialysewasser frei von ungebundenem Hapten.

2.3.2 Kopplung von DNP an Hämocyanin

Die Kopplung erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie beim HSA.

Der Reaktionsansatz lautet:

1000 mg K_2CO_3

500 mg Hämocyanin

1000 mg 2,4 -Dinitrobenzensulfonat - Na - Salz

Die Dialyse erfolgte gegen PBS, da das Produkt bei Dialyse gegen Wasser ausgefallen war.

2.3.3 Kopplung von DNP an bovines Gammaglobulin (BGG)

Die Kopplung erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie beim HSA.

Der Reaktionsansatz lautet:

1000 mg K_2CO_3

1000 mg BGG

1000 mg 2,4 Dinitrobenzensulfonat - Na - Salz

Die Dialyse erfolgte gegen Aqua bidest.

2.3.4 Kopplung von DNP an Polylysin

100 mg K_2CO_3 und 100 mg Polylysin wurden in 5 ml Aqua bidest gelöst. Daraufhin wurden 25 mg 2,4 - Dinitrobenzensulfonat - Na - Salz zugegeben.

Die Kopplung erfolgte unter den bei 2.3.1 beschriebenen Bedingungen.

2.3.5 Verwendung der Hapten - Carrier Komplexe

DNP-HSA und DNP-Hämocyanin wurden zur Immunisierung der Versuchstiere verwendet.

DNP-BGG diente zur Beschichtung der Elisa-Platten.

DNP-Polylysin wurde an bromzyanaktivierte Sepharose 4B zur Affinitätschromatographie gekoppelt ($73 \mu\text{mol/ml}$ Gel).

2.4 Immunmodulatoren

Zur Beeinflussung der Immunantwort wurden folgende Substanzen verwendet:

Lipopolysaccharid (LPS), eine Lipid A-reiche Fraktion aus *Salmonella minnesota* R 595

Levamisol

komplettes Freundsches Adjuvans (FCA)

2.5 Immunisierung, Bezeichnung der Versuchstiergruppen und Serumgewinnung

2.5.1 DNP - Standard

Zur Gewinnung hochtitriger Standard-Seren wurden 5 Kontroll- und 5 Dystiere nach einem bei Benedict (8) beschriebenen Schema immunisiert.

Die Tiere erhielten am Tag 0 (= Tag der Erstimmunisierung) und am Tag 14 je 20 mg DNP-HSA/kg Körpergewicht gelöst in 0,9%iger Kochsalzlösung (0,5 ml/kg) injiziert. Weitere Injektionen folgten an den Tagen 21, 25, 29 und 33, wobei die Verabreichung ab Tag 21 unter Zusatz von FCA (NaCl-FCA 1:1, 1 ml/kg) i.m. erfolgte. Die Blutentnahmen fanden jeweils vor den Immunisierungen statt. Am 42. Tag wurden die Tiere durch Herzpunktion entblutet.

2.5.2 DNP I

Je 6 Kontroll- und Dystiere wurden auf folgende Weise immunisiert:

- DNP I HSA: 20 mg/kg Körpergewicht DNP-HSA i.v.
- DNP I Häm 1: 5 mg/kg Körpergewicht DNP-Hämocyanin i.v.
- DNP I Häm 2: 0,5 mg/kg Körpergewicht DNP-Hämocyanin i.v.

Jeweils vor der Immunisierung, sowie 8, 14 und 21 Tage danach wurden die Blutproben entnommen.

Zur Wiederauffrischung der Immunantwort wurden 3, 5 und 12 Wochen nach der letzten Blutabnahme 5 µg/kg Körpergewicht LPS i.v. verabreicht. Jeweils vor den Applikationen sowie eine Woche danach wurden Blutproben entnommen.

2.5.3 DNP II

Je 6 Kontroll- und Dystiere wurden mit einer geringen Menge (0,4 µg/kg Körpergewicht) des jeweiligen Trägerproteins vor-immunisiert. Eine Woche darauf erfolgte die Immunisierung mit Hapten - Proteinkomplex auf folgende Weise:

- DNP II HSA : 20 mg/kg Körpergewicht DNP - HSA i.v.
 - DNP II Häm 1: 5 mg/kg Körpergewicht DNP - Hämocyanin i.v.
 - DNP II Häm 2: 0,5 mg/kg Körpergewicht DNP - Hämocyanin i.v.
- jeweils gelöst in 0,9%iger Kochsalzlösung.

Die Blutentnahmen wurden jeweils vor den Immunisierungen, sowie am 8., 14. und 21. Tag nach der zweiten Immunisierung durchgeführt.

2.5.4 DNP III

Je 6 Dystiere wurden auf folgende Weise immunisiert:

a) Vorimmunisierung: 0,4 µg/kg Körpergewicht Trägerprotein

b) Immunisierung: Eine Woche nach der Vorimmunisierung

- DNP III HSA : 20 mg/kg Körpergewicht DNP - HSA +
0,25 mg Levamisol/kg Körpergewicht
- DNP III Häm 1: 5 mg/kg Körpergewicht DNP - Hämocyanin +
0,25 mg Levamisol/kg Körpergewicht
- DNP III Häm 2: 0,5 mg/kg Körpergewicht DNP - Hämocyanin +
0,25 mg Levamisol/kg Körpergewicht

jeweils gelöst in 0,9%iger Kochsalzlösung.

Jeweils vor den Immunisierungen, sowie 8, 14 und 21 Tage nach der zweiten Immunisierung wurden die Blutproben entnommen.

Alle i.v. Injektionen erfolgten in die Flügelvene (V. ulna ris).

2.5.5 Serumgewinnung

Aus der Flügelvene entnommenes Blut wurde bei 37°C 60 min. lang inkubiert und anschließend über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Durch 10 min. langes Zentrifugieren bei 3000 U/min. wurde das Serum abgetrennt und bis zur Auswertung bei -20°C aufbewahrt.

2.6 Reinigung der Antikörper für die Elisa - Standards

2.6.1 Affinitätschromatographie an Sepharose 4 B

Zur Isolierung spezifischer Antikörper gegen das Hapten wurde die Affinitätschromatographie nach Lowe und Dean (59) durchgeführt.

DNP wurde als DNP-Polylysin an bromcyanaktivierte Sepharose 4B der Fa. Pharmacia gekoppelt.

Zur Gewinnung der haptenspezifischen Antikörper für Standards von gleichbleibender Qualität wurden Tiere der hochimmunisierten Gruppe (DNP - Sta) entblutet und das Serum über die Affinitätschromatographie - Säule (s.o.) gegeben.

Die eluierten anti-DNP-Antikörper wurden für die weiteren Tests antikörperfreien Agammaseren von chemisch bursektomierten Tieren (32) zugesetzt.

2.6.2 Bestimmung der Immunglobulinkonzentrationen:

Als Eichsubstanzen dienten gereinigte Hühner-Immunglobulinisotypen (80), die von Frau Dr. I. Schraner zur Verfügung gestellt wurden.

Die Konzentration der Antikörperisotypen in den Standards wurde mit Hilfe der isotypspezifischen Rocket-Immunelektrophorese (52) ermittelt.

2.7 Entwicklung eines isotypspezifischen Elisa-Systems

2.7.1 Lösungen und Puffer

a) Natrium - Carbonat - Puffer pH 9,6; zur Beschichtung der Elisa - Platten

8,37 g Na - Carbonat - 10 - Hydrat

6,00 g Na - Hydrogencarbonat

0,20 g Na - Azid

ad 1 l Aqua bidest

b) phosphatgepufferte Saline (PBS)-Tween

0,05% Tween 20 in PBS (pH 7,2)

c) Substratlösung

2 mg p- Nitrophenylphosphat wurden pro ml AMP - Puffer (2 Amino-2-methyl-1-propanol-Puffer 1:10 mit Aqua bidest verdünnt) gelöst.

2.7.2 Herstellung von Antikörper-Enzym-Konjugaten

Durch Immunisierung mit Immunglobulinisotypen (80) wurden Antiseren aus Kaninchen hergestellt und, durch Absättigen H-Ketten-spezifisch gemacht .

Die Antikörper wurden von den übrigen Serumbestandteilen durch Affinitätschromatographie an Huhn- IgG-, IgM- und IgA-Sepharosesäulen gereinigt und anschließend im Vakuum konzentriert.

Diese Antikörper wurden mit alkalischer Phosphatase (spez. Aktivität 2500 U/mg) nach Engvall und Perlmann (27) gekoppelt.

Das α -IgG- und α - IgM- Konjugat wurde 1:500 mit PBS-Tween verdünnt, das α -IgA Konjugat 1:200.

2.7.3 Durchführung des haptenspezifischen Elisa

Plattenbeschichtung

In Vorversuchen hat sich eine Konzentration von

30 µg DNP-BGG/ml Beschichtungspuffer als optimal erwiesen. Die Polystyrol-Microtiterplatten (Immunoplate II der Firma Nunc, Kamstrup) wurden mit 200 µl DNP-BGG (50 µg/ml Carbonatpuffer) pro Kavität beschichtet und anschließend 3 h bei 37°C und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach 6-maligem Waschen mit PBS-Tween (0,05% Tween 20) mittels eines Nunc-Elisa-Waschgerätes (Typ: Nunc Immuno Wash 12, Fa. Nunc, Wiesbaden) wurde PBS-Tween zur Verdünnung der Antisera in die Kavitäten pipettiert (Reihe 2: 90 µl; übrige Reihen: 50 µl).

Je 10 µl Antiserum wurden in die Kavitäten der Reihe 2 pipettiert (= 1:10 Vorverdünnung)

Mit einem "Titertek Motorised Hand Multidiluter" (Fa. Flow, Meckenheim) wurde eine geometrische 1:2 Verdünnungsreihe der Sera hergestellt.

Anschließend wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und 90 min. bei 37°C unter Rotation inkubiert.

Nach 6-maligem Waschen mit PBS-Tween wurden in jede Kavität 100 µl des isotypspezifischen Anti-Hühner-Immunglobulin-Enzymkonjugats gefüllt.

Anschließend wurden die Platten erneut mit Parafilm verschlossen und 90 min bei 37°C unter Rotation inkubiert.

Nach einem letzten 6-fachen Waschgang der Platten erfolgte die Zugabe von je 200 µl Substratlösung pro Kavität.

Nach 10 Minuten (Bestimmung von IgG und IgM) bzw. 15 Minuten (Bestimmung von IgA) wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von

50 µl 1N Natronlauge/Kavität abgestoppt.

Die Extinktionsmessung erfolgte mit einem Titertek Elisa-Ablesegerät (Fa. Flow, Meckenheim) bei 405 nm.

Die Farbintensität ist dabei ein Maß für die Menge an gebundenem Enzym und damit an Antikörper in der Ausgangsprobe.

Als Titer wurde der negative Logarithmus zur Basis 2 der Verdünnungsstufe angegeben, bei der eine Extinktion von 0,1 gemessen wurde (Endpunkttitration), wobei die Verdünnung des Serums mit PBS-Tween im Verhältnis 1:10 als unverdünnte Lösung bezeichnet wurde (Reihe 2 = Titerstufe 0). Lag die Extinktion von 0,1 zwischen zwei Verdünnungsstufen, so wurde der genaue Titer durch Interpolieren folgendermaßen bestimmt:

$$t = X - ((0,1 - L) / (H - L))$$

Dabei gilt: L = Extinktion bei der ersten log 2 -Verdünnung, die einen Wert von < 0.1 erreicht.

H = Extinktion bei der log 2 -Verdünnung, die gerade noch > 0.1 ist.

X = Verdünnungsstufe der Kavität mit der Extinktion = L.

2.7.4 Indirekter kompetitiver haptenspezifischer Elisa

Zur Erfassung der spezifischen, gegen das Hapten gerichteten Antikörper wurde versucht, durch Zugabe von Hapten zum Verdünnungspuffer (PBS-Tween) die Antikörperaktivität im Elisa zu hemmen.

Prinzip:

Dieser Elisa beruht auf der kompetitiven Hemmung der Antikörper durch freies Hapten, die darauf zurückzuführen ist, daß die haptenspezifischen Antikörper mit freiem Hapten eine Bindung eingehen, die in Konkurrenz zur Bindung zwischen Antikörper und Plattenbeschichtung (Hapten - Proteinkomplex) steht.

Mit steigender Haptenkonzentration im Puffer nimmt die Reaktion der haptenspezifischen Antikörper mit dem Hapten der Plattenbeschichtung ab, da die Reaktion mit freiem Hapten zunimmt. Daraus resultiert eine verminderte Titerbildung.

Durchführung:

Nach dem Waschen der beschichteten Elisa-Platten wurde PBS-Tween- wie oben beschrieben - zur Verdünnung der Antiseren in die Kavitäten pipettiert.

Dabei erfolgte das Füllen der Reihen A bis H alternierend mit PBS-Tween und PBS-Tween mit der DNP-Konzentration, die 50% der isotypspezifischen Antikörperaktivität hemmt, d.h. 0,005 mol/l bei der Bestimmung von IgG und IgA bzw. 0,01 mol/l bei der Bestimmung von IgM (siehe Ergebnisteil).

Im weiteren wurde wie beim nicht kompetitiven Elisa (s.o.) vorgegangen. Die Inkubation der Serumproben sowohl mit PBS-Tween als auch mit DNP in PBS-Tween ermöglichte die Titerbestimmung der ungehemmten Probe und der Probe nach 50%iger kompetitiver Hemmung.

Die Errechnung der Antikörpertiter erfolgte wie beim nicht kompetitiven Elisa (s.o.).

Der Berechnung der Antikörperkonzentrationen wurde ein modifiziertes Computerprogramm nach Caulfield und Shaffer (13) zugrundegelegt.

Die Antikörperkonzentrationen wurden dadurch errechnet, daß der Titer der Probe nach 50%iger Hemmung (= Differenz zwischen gehemmter und ungehemmter Standardprobe) bezogen wurde.

Die daraus resultierenden Antikörperkonzentration wurde nach folgender Formel errechnet:

$$C = A \cdot 2^{[\log_2(2^{t_1} - 2^{t_2}) - \log_2(2^{s_1} - 2^{s_2})]}$$

Dabei gilt:

C = Antikörperkonzentration der Probe (Elisaeinheiten)

A = Antikörperkonzentration der Standardprobe (mg/ml)

t₁ = Titer der nicht gehemmten Probe

t₂ = Titer der Probe nach 50% Hemmung

s₁ = Titer der ungehemmten Standardprobe

s₂ = Titer der Standardprobe nach 50% Hemmung

Die Antikörperkonzentrationen wurden als Elisaeinheiten angegeben, wobei 1 Elisaeinheit einer errechneten Konzentration von 1 µg/ml Antikörperisotyp entspricht. Diese stellen keine absoluten Mengenangaben dar, sondern sind lediglich Ausdruck der biologischen Wertigkeit der Antikörper der Probe im Vergleich zu den Antikörpern der eingesetzten Standardprobe.

2.8 Statistische Auswertung

Die in den Tabellen und Abbildungen angegebenen Werte stellen Mittelwerte dar. Zusätzlich wird die Standardabweichung angegeben. Zum Vergleich zweier empirischer Mittelwerte wurde der Student's t-Test durchgeführt (77).

3. Ergebnisse

3.1 Kopplung von DNP an Trägerproteine

DNP wurde - wie oben beschrieben - an verschiedene Trägerproteine gekoppelt. Abb. 1 zeigt das UV-Spektrum von HSA vor und nach der Kopplung mit DNP. Dabei wird die Ausbildung des neuen Absorptionsmaximums von DNP-HSA bei 360 nm deutlich. Ähnliche Spektren konnten auch bei den Kopplungen mit den anderen Proteinträgern erhalten werden.

Nach photometrischer Bestimmung der Konzentration der gekoppelten DNP-Moleküle bei 360 nm und Bestimmung der Proteinkonzentration wurden folgende Kopplungsprodukte erhalten:

DNP₁₉ - HSA bis DNP₂₆ - HSA

DNP₂₃₄ - Hämocyanin

DNP₃₃ - BGG bis DNP₄₁ - BGG

DNP₂₉ - Polylysin (jeder 9. Lysinrest wurde substituiert)

Die Indexzahl gibt die Anzahl der gekoppelten Haptenmoleküle je Proteinmolekül an.

3.2 Indirekter nichtkompetitiver Elisa

Abb. 2 zeigt die Elisa-Verdünnungsreihen des DNP-Standard Pools zur Bestimmung der anti-DNP-Antikörper vom IgG-Typ. Vom Pool (5650 ug IgG/ml) wurden Verdünnungen von 1:2 bis 1:128 in PBS-Tween hergestellt, aufgetragen und, wie im Methodenteil beschrieben wurde, jeweils in Zweierschritten weiterverdünnt.

Aus Abb. 2 geht hervor, daß die Extinktion im Elisa mit fortlaufender Verdünnung abnahm. Zwischen Serumverdünnung und Titerbildung bestand ein linearer Zusammenhang. Die Titerunterschiede zwischen zwei Verdünnungsstufen betragen eine Titerstufe und entsprachen damit einer Verdünnung von jeweils 1:2.

Entsprechende Kurvenverläufe wurden auch bei der Bestimmung der IgM- und IgA-Antikörper des Standardpools erhalten.

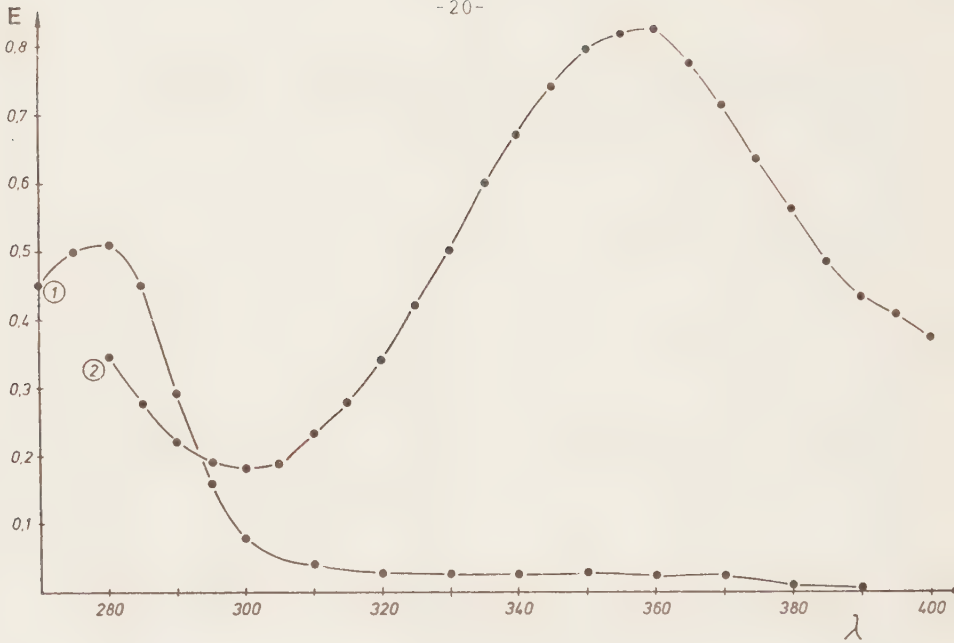


Abb. 1 : UV-Spektrum von HSA (1) 1 mg/ml und DNP-HSA (2) 0.13 mg/ml.

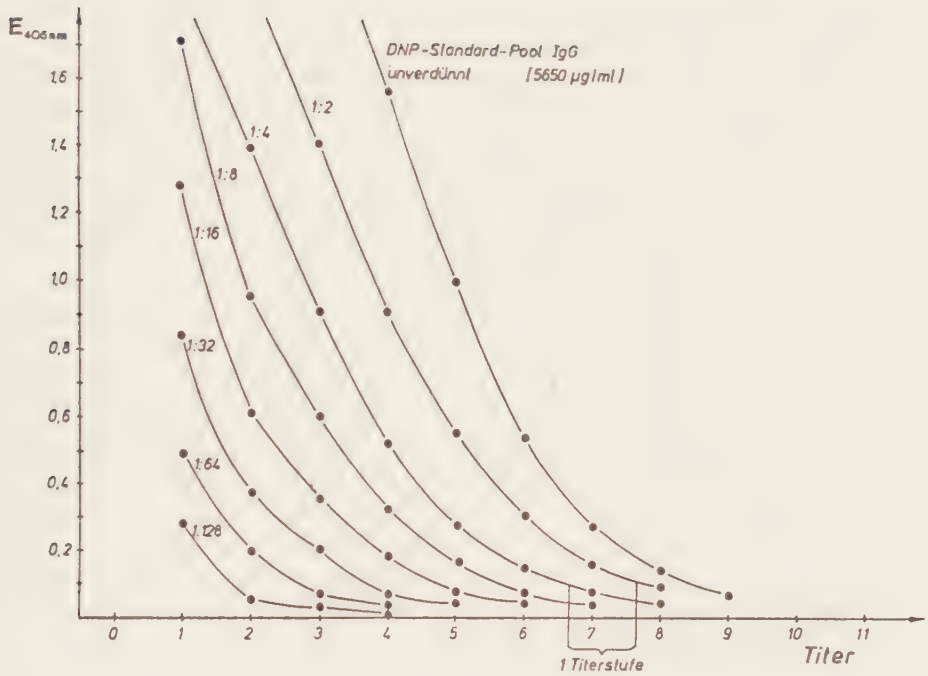


Abb. 2 : ELISA-Verdünnungsreihen von DNP-Standard Pool
unverdünnt (5650 µg IgG/ml) und 1:2 bis 1:128
verdünnt.
Beschichtung: 50 µg/ml DNP-BGG
Konjugat: anti-IgG-alkalische Phosphatase
(Verdünnung 1:500)

3.3 Indirekter kompetitiver Elisa

Proben des affinitätschromatographisch gereinigten DNP-Standardpools wurden mit unterschiedlichen DNP-Konzentrationen gehemmt und ihr Antikörpergehalt wurde mit dem Elisa getestet. Dabei wurden durch Verwendung der isotypspezifischen Kaninchen-anti-Huhn-Konjugate die einzelnen Antikörperisotypen (IgG, IgM, IgA) getrennt erfaßt. Zur Berechnung des Ausmaßes der Hemmwirkung wurde der Titer der nicht gehemmtten Probe als 100% Aktivität bezeichnet. Die entlogarithmierten Titer der einzelnen Hemmversuche wurden auf den entlogarithmierten Titer der nicht gehemmtten Probe bezogen.

Der Zusammenhang zwischen DNP-Konzentration im Elisa-Verdünnungspuffer und daraus resultierender Antikörperaktivität wird aus den Abb. 3-5 erkennbar. Es wird deutlich, daß zur 50%igen Hemmung der IgG- und IgA-Antikörper im vorliegenden System eine Konzentration von 0,005 mol/l DNP benötigt wurde, während die IgM-Antikörper erst mit 0,01 mol/l DNP zu etwa 50% gehemmt wurden.

Mit diesen so festgestellten DNP-Konzentrationen wurden im weiteren Standardantikörperproben mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen gehemmt und im Elisa getestet.

Die Antikörperkonzentrationen wurden dabei durch Variieren der Vorverdünnung in der Reihe 2 (siehe Material und Methoden) verändert.

Bei IgG entspricht zum Beispiel einer Vorverdünnung der Probe von 1:10 eine Konzentration von 5650 µg/ml.

Abb. 6 zeigt beispielhaft für das IgG den linearen Zusammenhang zwischen eingesetzter Antikörperkonzentration und Titerbildung im Elisa bei gleichzeitiger Hemmung der Antikörperaktivität mit 0,005 mol/l DNP im Verdünnungspuffer.

Ein entsprechender Zusammenhang konnte auch für die IgM- und IgA-Antikörper bei 50%iger Hemmung erhalten werden.

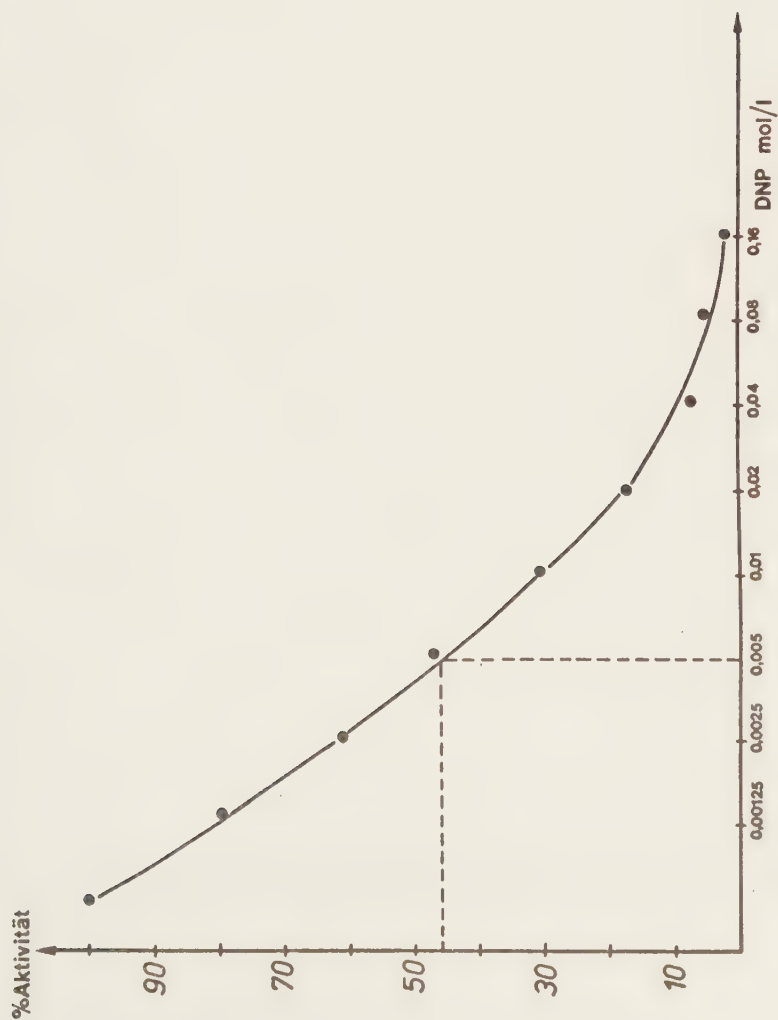


Abb. 3 : Hemmung von Anti-DNP IgG-Antikörpern durch freies DNP

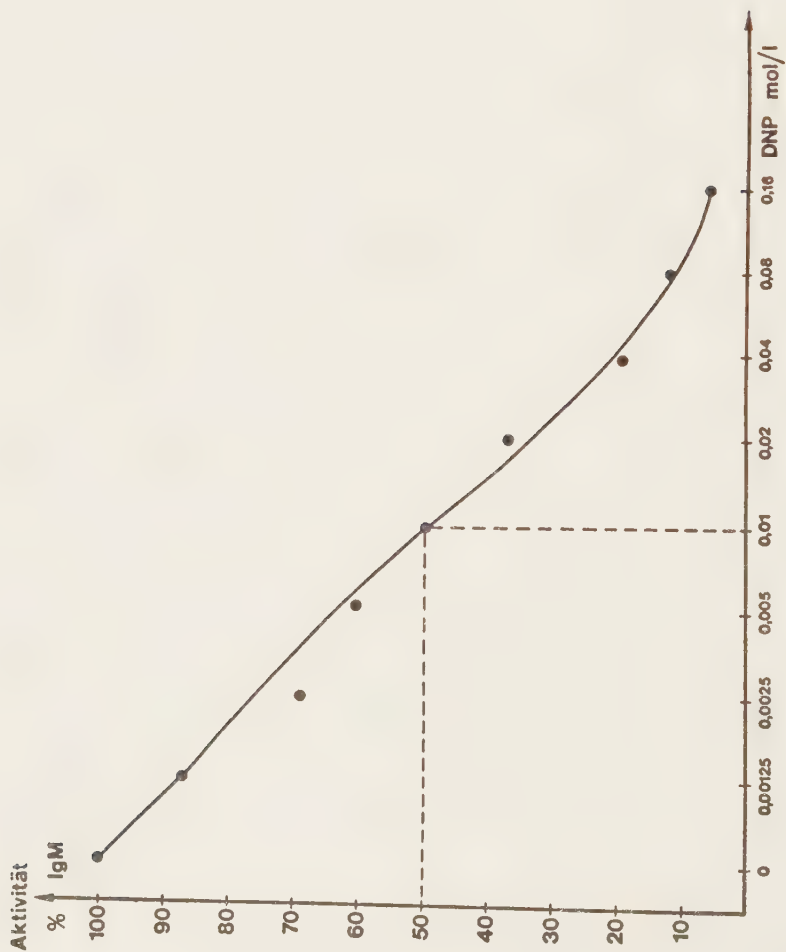


Abb. 4 : Hemmung von Anti-DNP IgM-Antikörpern durch freies DNP

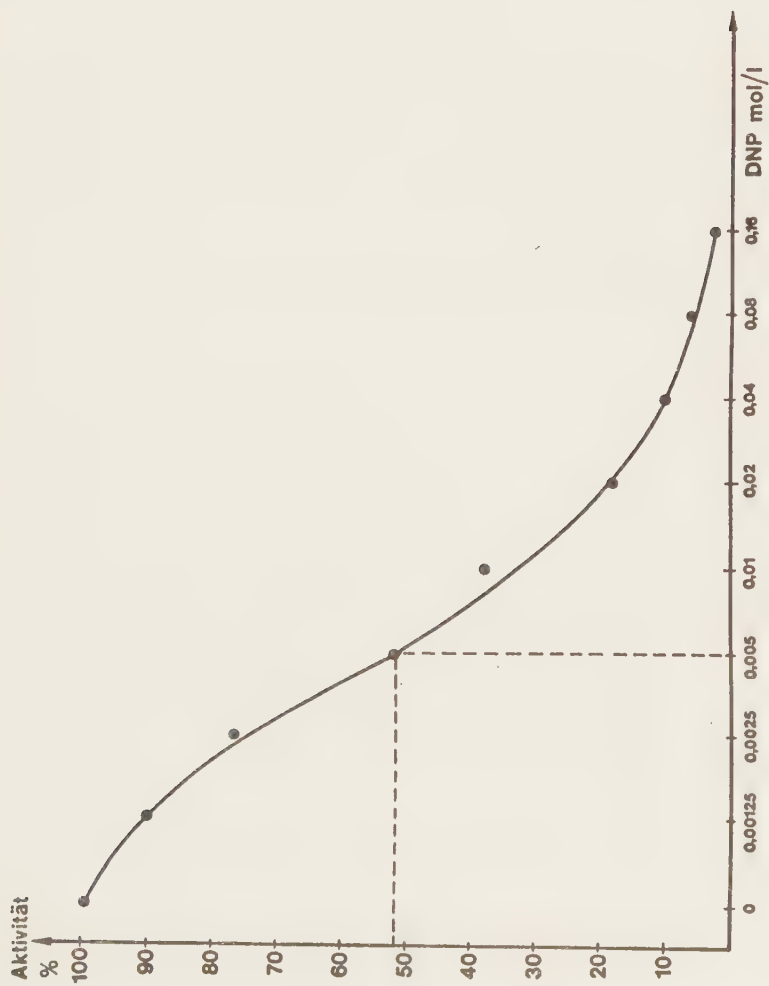


Abb. 5 : Hemmung von Anti-DNP IgA-Antikörpern durch freies DNP

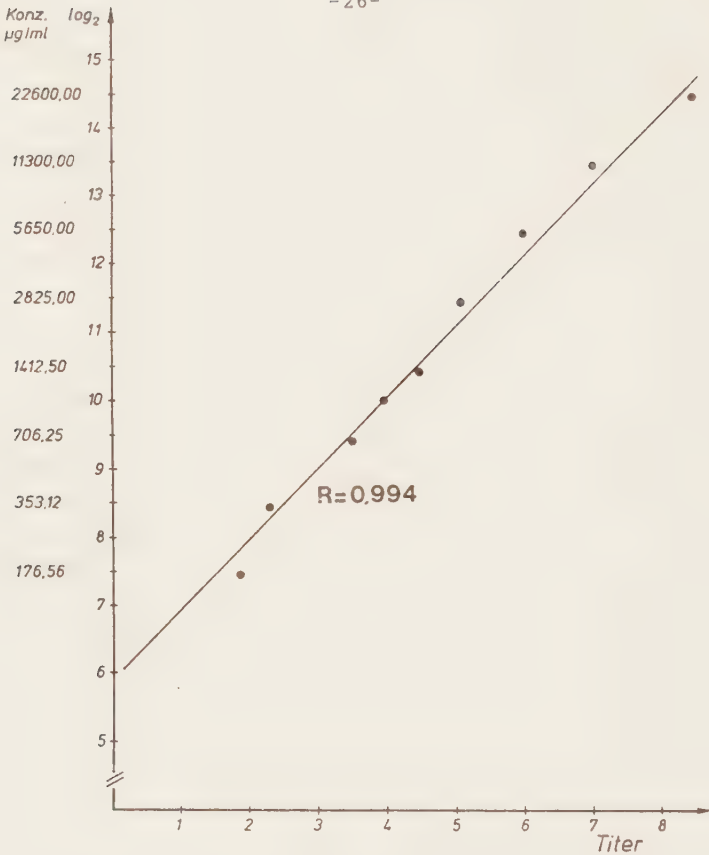


Abb. 6 : Lineare Regression zwischen den $\log_2$ Titern der eingesetzten anti-DNP Antikörperkonzentrationen (IgG) und den erreichten ELISA-Titern bei kompetitiver Hemmung mit 0.005 M DNP in PBS-Tween.

Regressionskoeffizient = 0.994.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die Seren der Versuchstiere im indirekten, kompetitiven, haptenspezifischen Elisa untersucht und ihre Antikörperkonzentrationen, wie im Methodenteil beschrieben, bestimmt.

Mit Hilfe des entwickelten Elisasystems wurde die Immunreaktion von Kontrollhühnern der HNL-Linie und von dysgammaglobulinämischen Hühnern auf verschiedene Immunisierungsmethoden mit DNP-Carrier-Komplexen untersucht.

Die folgenden Abbildungen zeigen graphisch die Mittelwerte der Anti-DNP-Titer (IgG, IgM und IgA) der einzelnen Versuchstiergruppen, ausgedrückt als Elisaeinheiten/ml (s.o.)

Die entsprechenden Einzelwerte, sowie die Standardabweichungen sind den zugehörigen Tabellen zu entnehmen.

3.4 Anti-DNP-Antikörperkonzentrationen nach Behandlung mit DNP-Trägerprotein und anschließender LPS-Applikation

3.4.1 DNPI-HSA

Abb. 7 und 8 zeigen die Reaktion von Kontrolltieren und dysgammaglobulinämischen Hühnern nach Immunisierung mit 20 mg/kg Körpergewicht DNP-HSA

Die Kontrolltiere reagierten auf die Immunisierung innerhalb einer Woche mit einer deutlichen Zunahme der IgG-Antikörperkonzentration von durchschnittlich 1024 Elisaeinheiten/ml vor der Immunisierung auf 6625 Elisaeinheiten/ml am 8. Tag nach der Immunisierung.

Dies entspricht einer Zunahme von etwa 600%.

Die IgG-Titer nahmen daraufhin wieder kontinuierlich ab, um ab dem 56. Tag nach der Immunisierung wieder die Ausgangswerte einzunehmen.

Auch die IgM-Antikörperkonzentrationen stiegen bei dieser Gruppe nach der Immunisierung, wobei am Tag 14 die höchsten

Konzentrationen mit durchschnittlich 1821 Elisaeinheiten/ml erreicht wurden (Präimmunseren: 529 Elisaeinheiten/ml).

Wie aus Tab. 2 ersichtlich ist, traten dabei sehr starke individuelle Schwankungen innerhalb der Gruppe auf. Lediglich die Tiere 421 und 426 zeigten einen deutlichen Antikörperpeak am Tag 14, während andere Hühner wie 653 und 661 zunächst mit einer Abnahme der IgM-Konzentration und Peakbildung am Tag 21 bzw. 42 reagierten.

Die haptenspezifischen Antikörper vom IgA-Isotyp erreichten bei dieser Tiergruppe mit 6 Elisaeinheiten/ml am 8. Tag nach der Immunisierung ihren Höhepunkt, um dann ebenfalls wieder auf die Ausgangswerte zurückzugehen. Wie aus Tab. 3 zu ersehen ist, ergab sich nur eine unwesentliche IgA-Antikörperproduktion.

Lediglich bei Tier 421 kam es zu einer deutlichen Steigerung von 9 Elisaeinheiten/ml vor der Immunisierung auf 29 Elisaeinheiten 8 Tage später.

Die Verabreichung von LPS 42,56 und 105 Tage nach der Immunisierung zeigte bei dieser Gruppe keine deutlichen Auswirkungen.

Bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern waren keine haptenspezifischen IgG-Präimmuntiter feststellbar. Vier Tiere dieser Gruppe bildeten auch im weiteren Verlauf keine IgG-Antikörper (siehe Tab. 1). Lediglich das Huhn 2633 reagierte mit einer starken IgG-Produktion, die am Tag 14 einen Peak von 11966 Elisaeinheiten/ml erreichte. Auch das Tier 2891 zeigte eine geringgradige IgG-Antikörperproduktion, die am Tag 8 mit 472 Elisaeinheiten/ml einen Höhepunkt erreichte.

Auf die Immunisierung mit 20 mg/kg Körpergewicht DNP-HSA reagierten die dysgammaglobulinämischen Tiere mit einer deutlichen Produktion von IgM-Antikörpern, die am Tag 8 mit durchschnittlich 1519 Elisaeinheiten/ml im Gegensatz zu 379 Elisaeinheiten/ml im Präimmunserum einen Peak ausbildete, die

Werte der Kontrolltiere aber nicht übertraf.

Auch die IgA-Antikörper waren am Tag 8 mit 13 Elisaeinheiten/ml deutlich vermehrt.

Die Verabreichung von LPS führte bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern nicht zur Bildung von IgG-Antikörpern. Auch bei den Reagenten 2633 und 2891 (Tab. 1) konnte keine Stimulierung festgestellt werden. Bis auf die Tiere 3165 und 3199 reagierten die Tiere dieser Versuchsgruppe aber auf die 2. und 3. LPS-Gabe mit einer deutlichen Zunahme der IgM-Antikörperproduktion an den Tagen 63 und 112 (Tab. 2).

2601 und 2891 zeigten nach der ersten LPS-Applikation erhöhte IgA-Titer (Tab. 3).

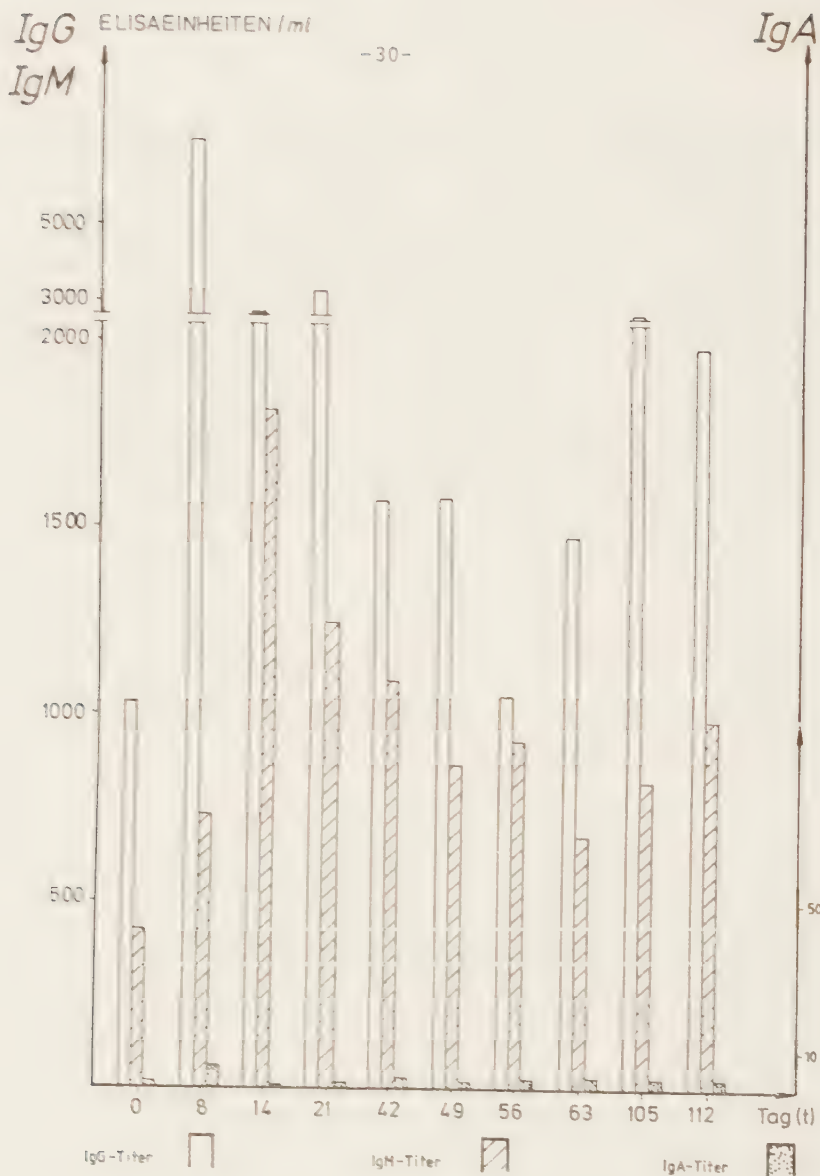


Abb.7 Anti-DNP-Titer (Elisaeinheiten/ml) von Kontrolltieren der Gruppe DNP I-HSA nach Immunisierung mit 20 mg/kg KG DNP-HSA am Tag 0. Jeweils 5 μ g/kg KG LPS an den Tagen 42, 63 und 105.
n und s siehe Tabbl. 1, 2 und 3

IgG ELISAEINHEITEN / ml
IgM

-31-

IgA

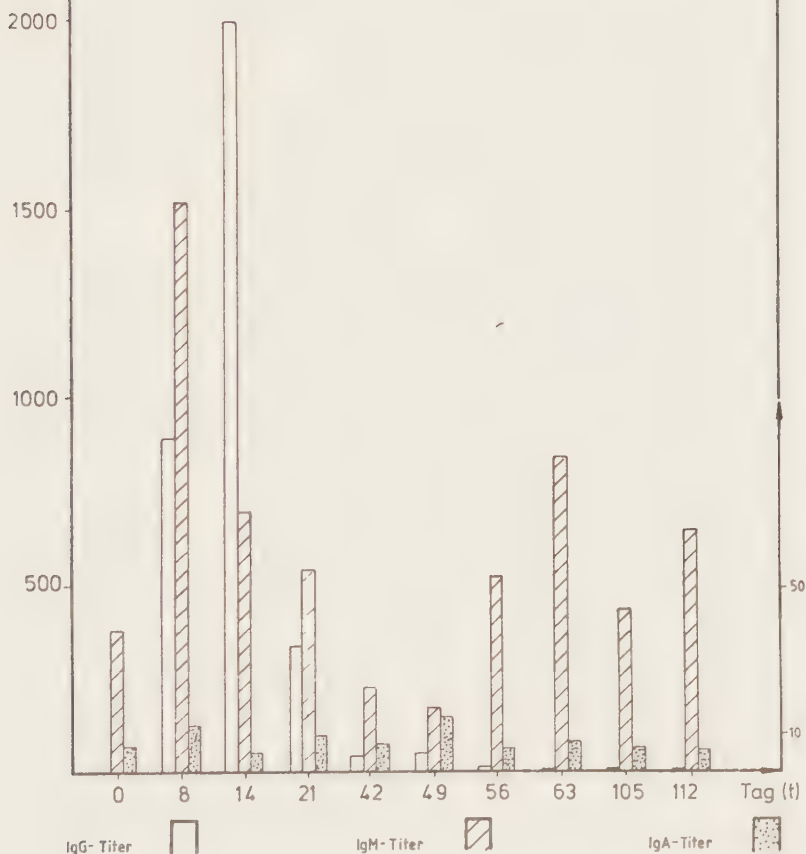


Abb.8 Anti-DNP Antikörpertiter (Elisaeinheiten/ml) von dysgammaglobulinämischen Hühnern der Gruppe DNP I-HSA nach Immunisierung mit 20 mg/kg KG DNP-HSA am Tag 0. Jeweils 5 µg/kg KG LPS an den Tagen 42,63 und 105.

n und s siehe Tabb. 1, 2 und 3

3.4.2 DNP I - Häm 1

Die Abb. 9 und 10 zeigen die Reaktion von Kontrolltieren und dysgammaglobulinämischen Hühnern nach Immunisierung mit 5 mg/kg Körpergewicht DNP-Hämocyanin

Jeweils am 14. bzw. 8. Tag erreichten die IgG- bzw. IgM-Antikörperkonzentrationen der Kontrolltiere ihre Höchstwerte von 3910 Elisaeinheiten/ml bzw. 3073 Elisaeinheiten/ml. Die IgG-Antikörperkonzentration stieg am 112. Tag noch einmal bis fast zum Höchstwert an, während die IgM-Antikörperkonzentration bis auf leichte Schwankungen am 21., 56. und 112. Tag konstant abfiel.

Die IgA-Antikörperkonzentrationen zeigten am 8. Tag einen kleinen Höhepunkt, um dann am 112. Tag noch einmal um das 6-fache auf 70 Elisaeinheiten/ml anzusteigen, wobei es jedoch innerhalb der Gruppe zu starken individuellen Schwankungen gekommen war (siehe Tab. 6). Die Tiere 413, 1157 und 1159 zeigten einen deutlichen Präimmuntiter; außerdem produzierten 413 und 1157 nach jeder LPS-Gabe vermehrt IgA-Antikörper.

Die dysgammaglobulinämischen Tiere zeigten, bis auf ein Huhn (3137), keine IgG-Antikörperanfangskonzentrationen. Die Hühner 3125, 3132 und 3138 wiesen, im Vergleich zu den Kontrolltieren, geringe Anstiegswerte auf, die dann auch wieder bis 0 abfielen (siehe Tab. 4).

Die IgM-Antikörperkonzentration erreichte mit 1443 Elisaeinheiten/ml am 8. Tag ihren Höchstwert. Bezogen auf den Präimmuntiter ergab sich eine nahezu gleichhohe prozentuale Steigerung von 273% im Vergleich zu der der Kontrollhühner von 282%. Nach vorheriger LPS-Gabe wurde am 49. Tag noch einmal eine Antikörperkonzentration von 1440 Elisaeinheiten/ml erreicht, was jedoch hauptsächlich auf das Tier 3137 zurückzuführen ist (siehe Tab. 5).

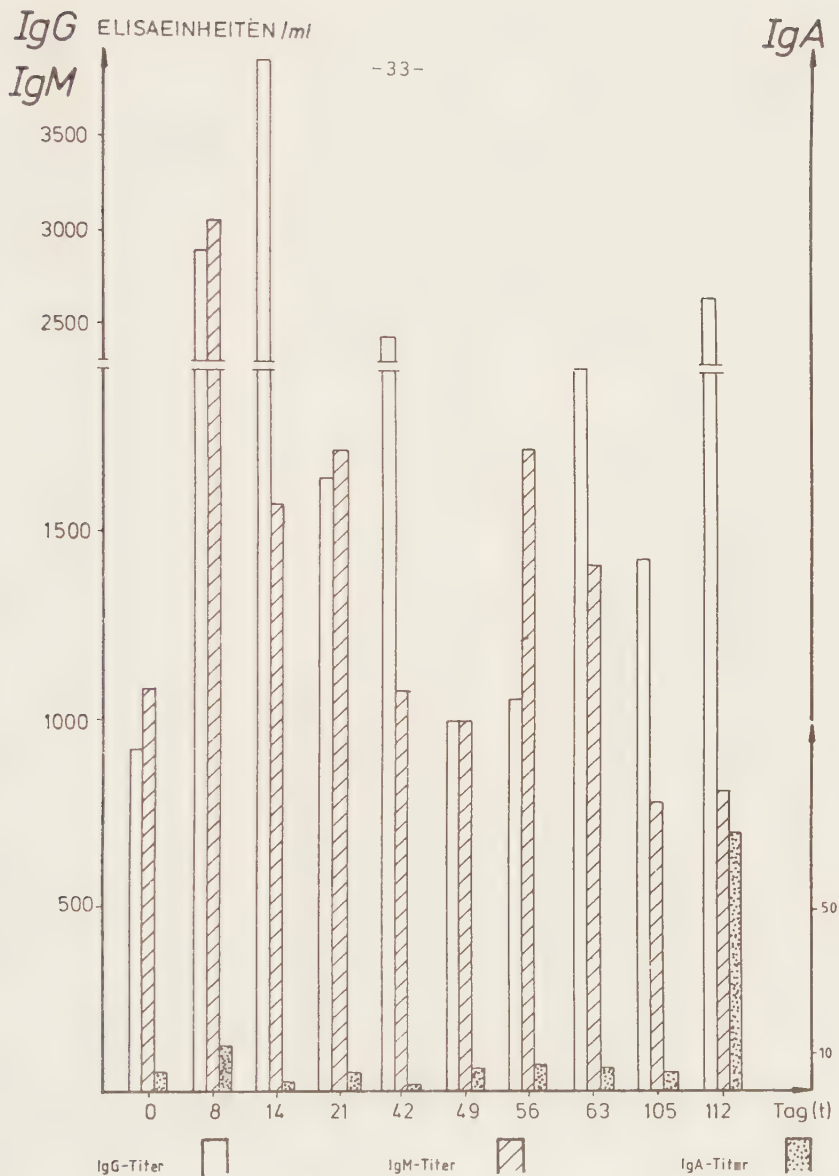


Abb.9 Anti-DNP Antikörpertiter (Elisaeinheiten/ml) von Kontrolltieren der Gruppe DNP I-Häm1 nach Immunisierung mit 5 mg/kg KG DNP-Häm1 am Tag 0. Jeweils 5 μ g/kg KG LPS an den Tagen 42, 63 und 105.

n und s siehe Tab. 4, 5 und 6



Abb.10 Anti-DNP Antikörpertiter (Elisaeinheiten/ml) von dysgammaglobulinämischen Hühnern der Gruppe DNP I-HämI nach Immunisierung mit 5 mg/kg KG DNP-Häm am Tag 0. Jeweils 5 μ g/kg KG LPS an den Tagen 42, 63 und 105.

n und s siehe Tab. 4, 5 und 6

Die IgA-Antikörper wiesen am 21. Tag einen Peak von 107 Elisaeinheiten/ml auf, der das dreifache der Ausgangskonzentration betrug, um sich dann am 112. Tag noch einmal zu verdoppeln. Die IgA-Konzentrationen waren somit größer als die der Kontrolltiere, wobei jedoch zu berücksichtigen bleibt, daß auch die Anfangstitel bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern höher lagen.

3.4.3 DNP I - Häm 2

Die Abb. 11 und 12 zeigen die Reaktion von Kontrolltieren und dysgammaglobulinämischen Hühnern nach Immunisierung mit 0,5 mg/kg Körpergewicht DNP-Hämocyanin

Auch bei dieser Immunisierung waren die IgG-Antikörperkonzentrationen bei den Kontrolltieren am 8. und am 14. Tag am höchsten und betrugen etwa das Zweifache der Ausgangskonzentration (individuelle Schwankungen siehe Tab. 7).

Die IgM-Antikörper stiegen am 8. Tag durchschnittlich um 214% auf 817 Elisaeinheiten/ml und am 49. Tag nach LPS-Gabe um 293% auf 1117 Elisaeinheiten/ml.

Sämtliche Tiere zeigten, im Gegensatz zu den IgG- und IgM-Antikörpern, vor der Injektion von DNP-Hämocyanin keine bzw. sehr geringe Mengen an Anti-DNP-IgA. Wie aus Tab. 9 ersichtlich ist, reagierten die einzelnen Kontrolltiere auf die Immunisierung nicht oder sehr geringfügig mit der Produktion von IgA-Antikörpern.

Die Verabreichung von LPS zeigte bei dieser Gruppe keine deutlichen Auswirkungen auf die Antikörperbildung.

Spezifische IgG-Antikörper waren bei den dysgammaglobulinämischen Tieren nicht nachweisbar.

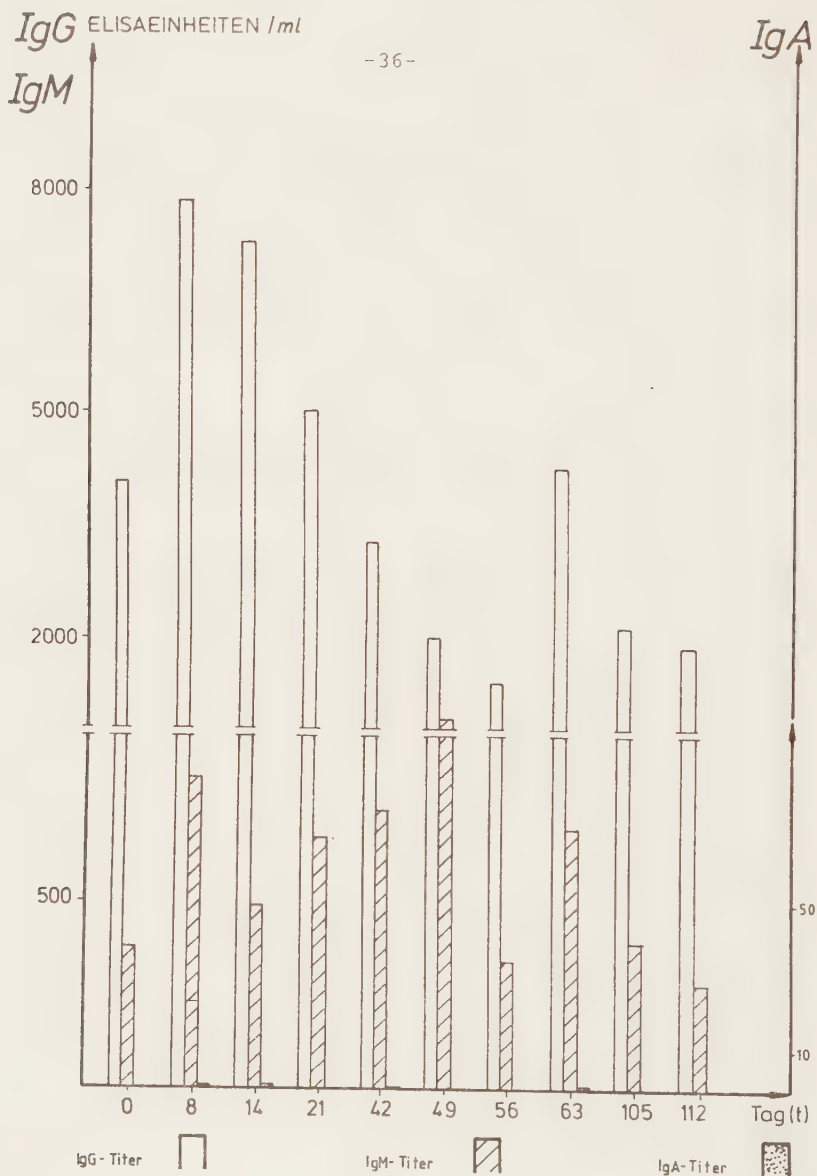


Abb.11 Anti-DNP Antikörpertiter (Elisaeinheiten/ml) von Kontrolltieren der Gruppe DNP I-Häm 2 nach Immunisierung mit 0,5 mg/kg KG DNP-Häm am Tag 0. Jeweils 5 µg/kg KG LPS an den Tagen 42, 63 und 105.

n und s siehe Tab. 7, 8 und 9

IgM ELISAEINHEITEN/ml

-37-

IgA



Abb.12 Anti-DNP Antikörpertiter (Elisaeinheiten/ml) von dysgammaglobulinämischen Hühnern der Gruppe DNP I-Häm 2 nach Immunisierung mit 0,5 mg/kg KG DNP-Häm am Tag 0. Jeweils 5 µg/kg KG LPS an den Tagen 42,63 und 105.

n und s siehe Tab. 7, 8 und 9

Die IgM-Antikörperkonzentration stieg durchschnittlich bis zum 21. Tag auf das Doppelte der Anfangskonzentration an, und zeigte im weiteren Verlauf nach jeder LPS-Gabe eine leichte Zunahme. Die Konzentration lag nach jeder LPS-Verabreichung deutlich über der Anfangskonzentration, erreichte jedoch nie die Höchstkonzentration von 1192 Elisaeinheiten/ml am 21. Tag. Bei individueller Betrachtung erwiesen sich jedoch nur die Tiere 3195 und 3224 als regelmäßige Reagenten auf jede der LPS-Injektionen; die anderen 4 Tiere reagierten teilweise mit Antikörperdepression (siehe Tab. 8).

Mit einer Ausnahme (3195; Tab. 9) bildeten die dysgammaglobulinämischen Tiere IgA-Antikörper, wobei die Mittelwerte deutlich höher lagen, als die der Kontrolltiere.

3.5 Anti-DNP-Antikörper nach Vorimmunisierung mit Trägerprotein und anschließender Behandlung mit DNP-Trägerprotein

3.5.1 DNP II - HSA

Die Abb. 13 und 14 zeigen die Reaktion von Kontrolltieren und dysgammaglobulinämischen Hühnern nach Vorimmunisierung mit 0,4 µg/kg Körpergewicht HSA und Immunisierung mit 20 mg/kg Körpergewicht DNP-HSA

In dieser Gruppe wurden die höchsten IgG-Antikörperkonzentrationen überhaupt gemessen.

Am 14. Tag wurde bei den Kontrolltieren der Peak von 24433 Elisaeinheiten/ml erreicht, der das 54-fache der Ausgangskonzentration betrug; wobei die Werte an den Blutentnahmetagen davor und danach ebenfalls in dieser Größenordnung lagen.

Die haptenspezifischen IgM-Antikörperproduktion war im Gegensatz zur IgG-Produktion recht gering. Sie lag am 8. Tag nur um etwa 60% höher als am Tag der Immunisierung und fiel dann wieder ab.

Die Anti-DNP IgA-Titer erreichten in dieser Gruppe durch-

schnittlich wiederum ihre höchsten Werte, was jedoch hauptsächlich auf die beiden Tiere 270 und 294 zurückzuführen ist (siehe Tab. 12). Beide Tiere wiesen auch einen hohen Anfangstiter am Tag 0 auf.

Auffälligerweise wurden in der Gruppe der dysgammaglobulinämischen Tiere von allen, bis auf den Nichtreagenten 3100, Anti-DNP IgG-Antikörper produziert, wobei keinerlei Anfangstiter vorlagen (siehe Tab. 10). Die Mittelwerte bewegten sich in der Größenordnung der Kontrollgruppe. Der Peak von 20620 Elisaeinheiten/ml wurde am 14. Tag erreicht.

Die IgM-Antikörperkonzentration lag am 8. Tag mit einer durchschnittlichen Steigerung auf 1999 Elisaeinheiten/ml am höchsten und fiel dann wieder konstant ab. Bei individueller Betrachtung zeigte das Tier 3070 seinen Peak jedoch am 14. Tag und das Huhn 3099 produzierte nach einem sehr hohen Präimmuntiter kontinuierlich immer weniger Antikörper.

Die IgA-Antwort betrug am 8. Tag das 7-fache des Ausgangswertes, um dann wieder abzusinken; wobei jedoch nur die Tiere 3095 und 3112 an diesem Tag ihren Peak zeigten, die übrigen am 14. Tag bzw. das Huhn 3104 erst am 21. Tag (siehe Tab. 12)

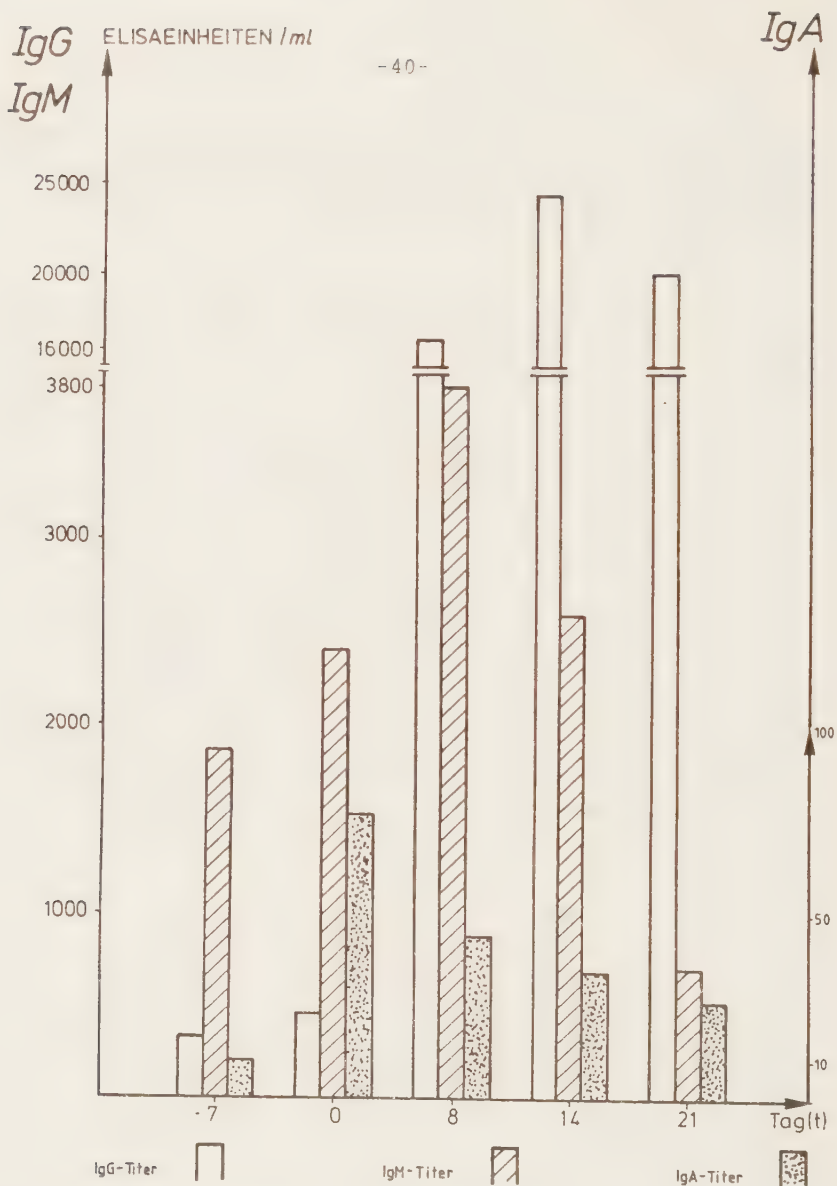


Abb.13 Anti-DNP Antikörpertiter (Elisaeinheiten/ml) von Kontrolltieren der Gruppe DNP II-HSA nach Vorimmunisierung mit 0,4 μ g/kg KG HSA am Tag -7 und Immunisierung mit 20 mg/kg KG DNP^HHSA am Tag 0.

n und s siehe Tab. 10, 11 und 12

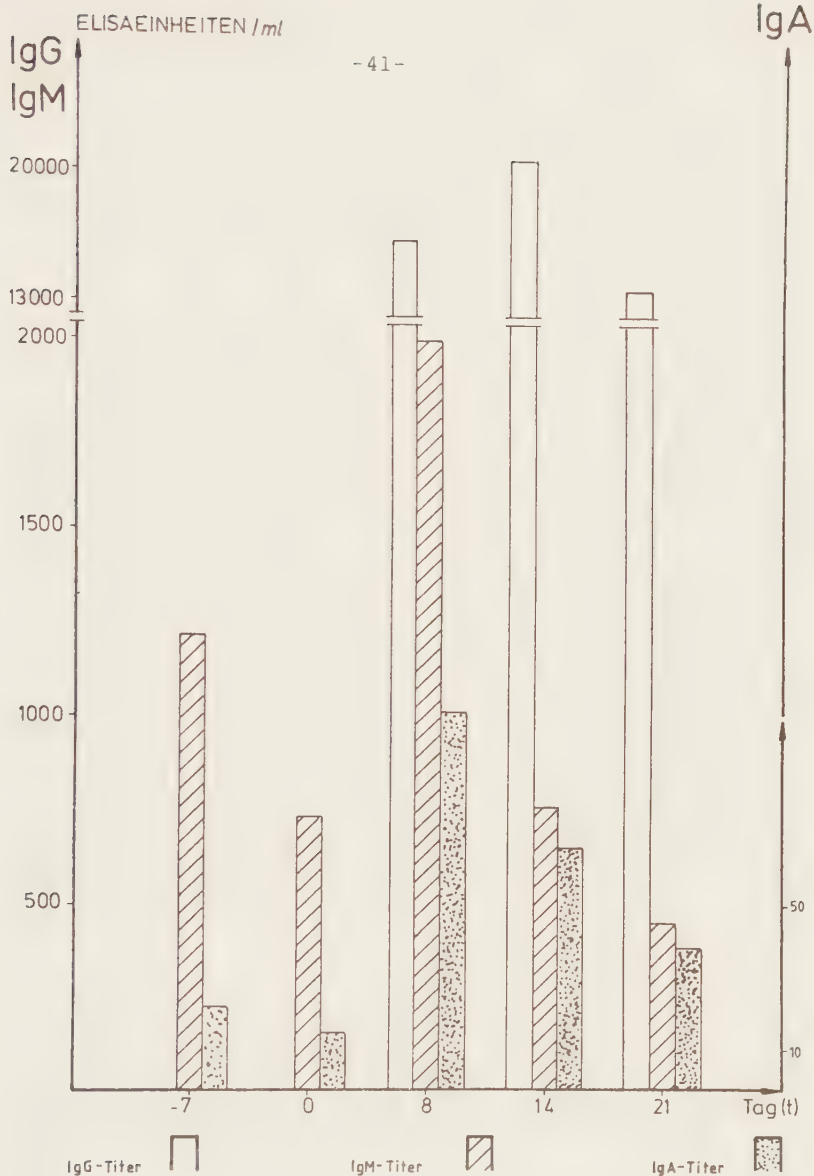


Abb. 14 Anti-DNP Antikörpertiter (Elisaeinheiten/ml) von dysgammaglobulinämischen Hühnern der Gruppe DNP II-HSA nach Vorimmunisierung mit 0,4 µg/kg KG HSA am Tag -7 und Immunisierung mit 20 mg/kg KG DNP HSA am Tag 0.

n und s siehe Tab. 10, 11 und 12

3.5.2 DNP II - Häm 1

Die Abb. 15 und 16 zeigen die Reaktion von Kontrolltieren und dysgammaglobulinämischen Hühnern nach Vorimmunisierung mit 0,4 µg/kg Körpergewicht Hämocyanin und Immunisierung mit 5 mg/kg Körpergewicht DNP-Hämocyanin

Die IgG- und IgM-Antikörperkonzentrationen der Kontrollgruppe stiegen bis zum 8. Tag auf das 7 bzw. 2 1/2 fache der Ausgangskonzentration, um anschließend wieder abzufallen. Ein Tier erwies sich dabei in Hinblick auf die IgM-Antikörperproduktion als Nichtreagent, zeigte auch im Gegensatz zu den anderen Tieren keinerlei Anfangstitel (siehe Tabb. 13 und 14).

Erstaunlicherweise wurden am Tag der Vorimmunisierung die meisten IgA-Antikörper gemessen; anschließend nur noch darunterliegende Werte, so daß also von keiner Anti-DNP IgA-Produktion gesprochen werden kann. Im Vergleich zur DNP I - Häm 1 Gruppe war der IgG-Peak mit 3796 Elisaeinheiten/ml und einer prozentualen Steigerung von 753% etwas höher als der am Tag 14 stattfindende Vergleichspeak mit 3910 Elisaeinheiten/ml und einer Steigerung von 427%; die höchste IgM-Antikörperkonzentration von 624 Elisaeinheiten/ml hingegen war niedriger als die der DNP I-Gruppe mit 3073 Elisaeinheiten/ml, wobei sich die prozentualen Steigerungsraten von 253% bzw. 282% aber entsprachen.

Haptenspezifische IgG-Antikörper waren bei den dysgammaglobulinämischen Tieren nicht nachweisbar.

Die IgM-Antikörpertiter erreichten im mittel am 8. und 21. Tag zwei Höhepunkte, die leicht über den Werten der Kontrolltiere lagen. Bei individueller Betrachtung zeigte es sich jedoch, daß der zweite Peak nur durch die Tiere 3181 und 3186 hervorgerufen wurde, da die übrigen Werte ansonsten stets niedriger als am Tag 8 waren (siehe Tab. 14).

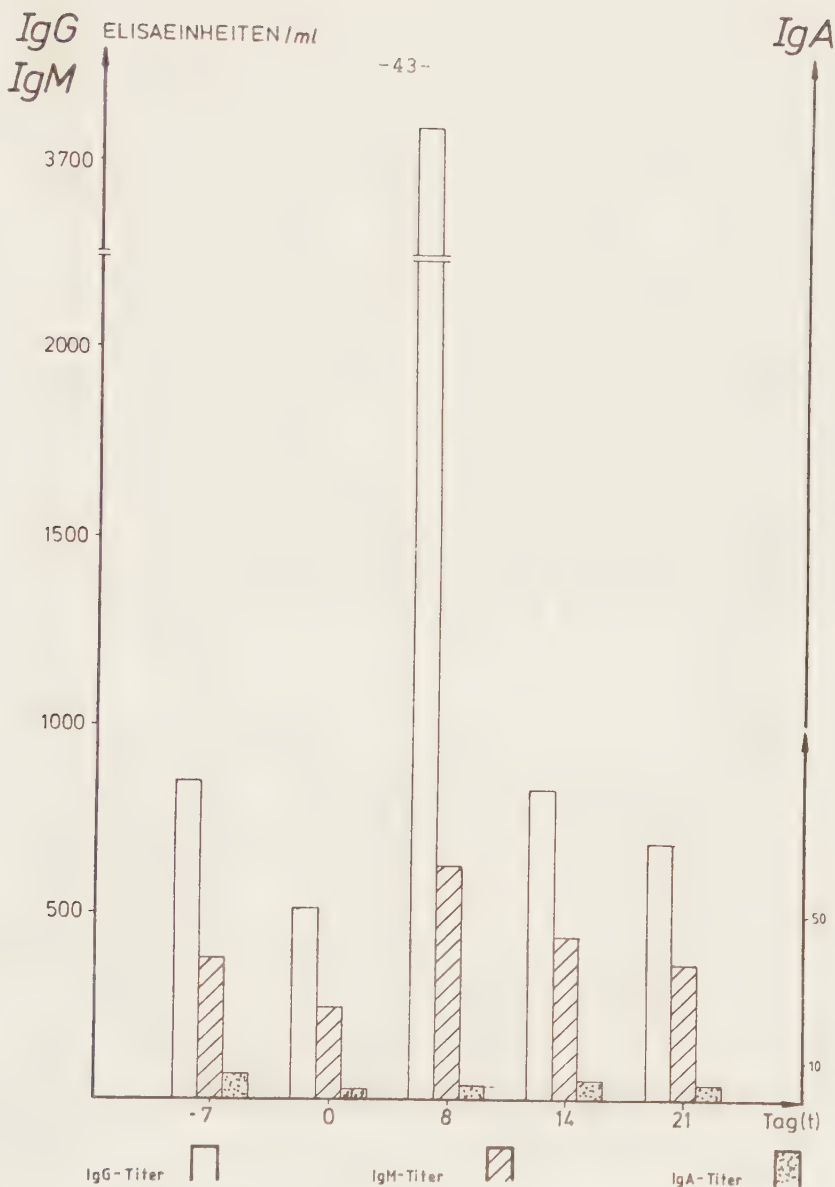


Abb.15 Anti-DNP Antikörpertiter (Elisaeinheiten/ml) von Kontrolltieren der Gruppe DNP II-HämI nach Vorimmunisierung mit 0,4 µg/kg KG HämI am Tag -7 und Immunisierung mit 5 mg/kg KG DNP-HämI am Tag 0.

n und s siehe Tab. 13, 14 und 15

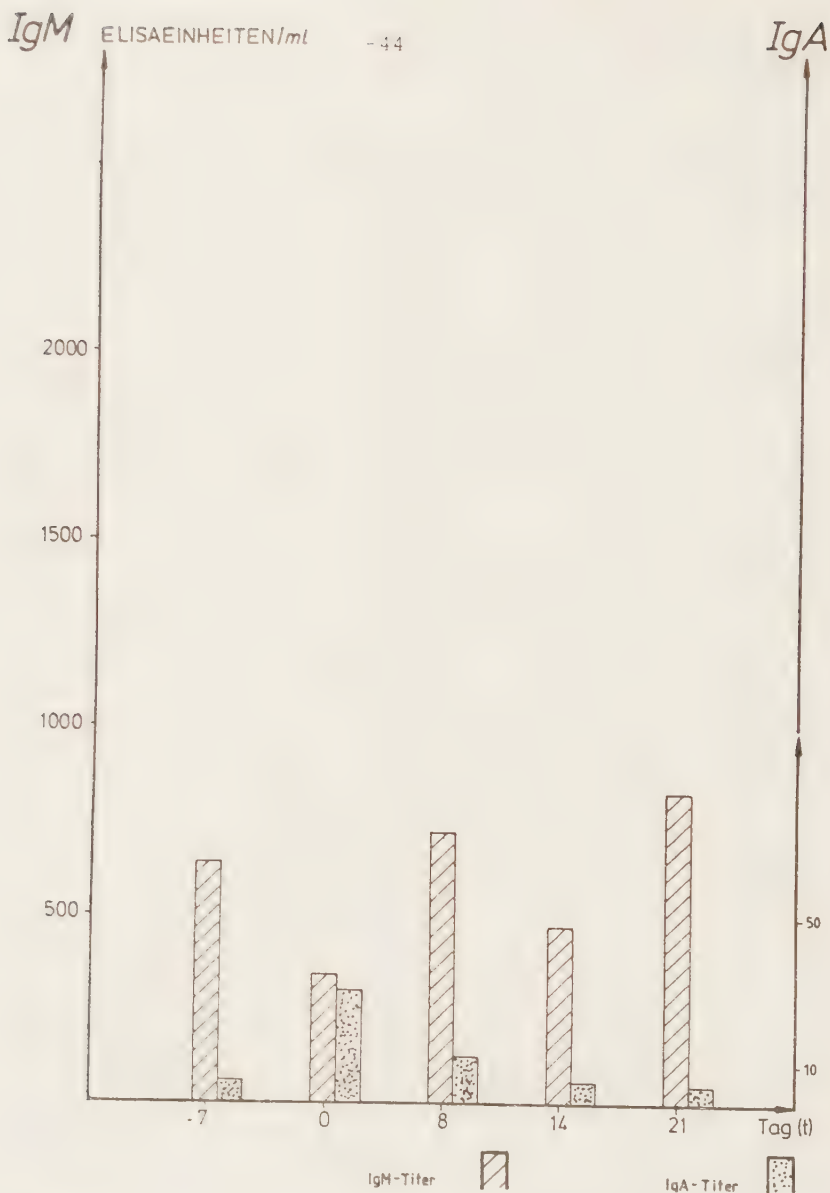


Abb. 16 Anti-DNP Antikörpertiter (Elisaeinheiten/ml) von dysgammaglobulinämischen Hühnern der Gruppe DNP II-Häm1 nach Vorimmunisierung mit 0,4 µg/kg KG Häm am Tag -7 und Immunisierung mit 5 mg/kg KG DNP-Häm am Tag 0.

n und s siehe Tab. 13, 14 und 15

Das Huhn 3182 zeichnete sich durch einen relativ hohen Präimmun-titer am Tag 7 und danach konstant abfallender Antikörperproduktion aus.

Die durchschnittlichen IgA-Antikörper-Konzentrationen lagen wiederum deutlich über denen der Kontrolltiere, wobei erstaunlicherweise der höchste Titer am Tage der Immunisierung, d.h. 7 Tage nach der Vorimmunisierung erreicht wurde, was jedoch auf die Hühner Nr. 3186 und 3188 mit 18 bzw. 82 Elisa-einheiten/ml zurückzuführen ist (siehe Tab. 15). Lediglich die Tiere 3182 und 3184 reagierten mit eindeutiger, hapten-spezifischer Ant-DNP IgA-Produktion auf die Immunisierung. Im Vergleich lagen die Höchstwerte der DNP I - Häm 1-Gruppe bei der IgM- und IgA-Antikörperproduktion jedesmal deutlich über denen der DNP II-Gruppe. Auch bildeten 4 der DNP I-Tiere IgG-Antikörper, was in der Vergleichsgruppe nicht der Fall war.

3.5.3 DNP II - Häm 2

Die Abb. 17 und 18 zeigen die Reaktion von Kontrolltieren und dysgammaglobulinämischen Hühnern nach Vorimmunisierung mit 0,4 µg/kg Körpergewicht Hämocyanin und Immunisierung mit 0,5 mg/kg Körpergewicht DNP-Hämocyanin

Ähnlich wie die Vergleichsgruppe DNP I - Häm 2 (s.o.) reagierten sowohl die Kontrollhühner, als auch die dysgammaglobulinämischen Tiere trotz Vorimmunisierung mit Proteinträger nur geringgradig auf die Immunisierung mit DNP-Hämocyanin (Abb. 17 und 18). Die starken individuellen Unterschiede bezüglich der Größe der Antikörperkonzentration und des Zeitpunktes der Peakbildung sind aus den Tab. 16, 17 und 18 ersichtlich.

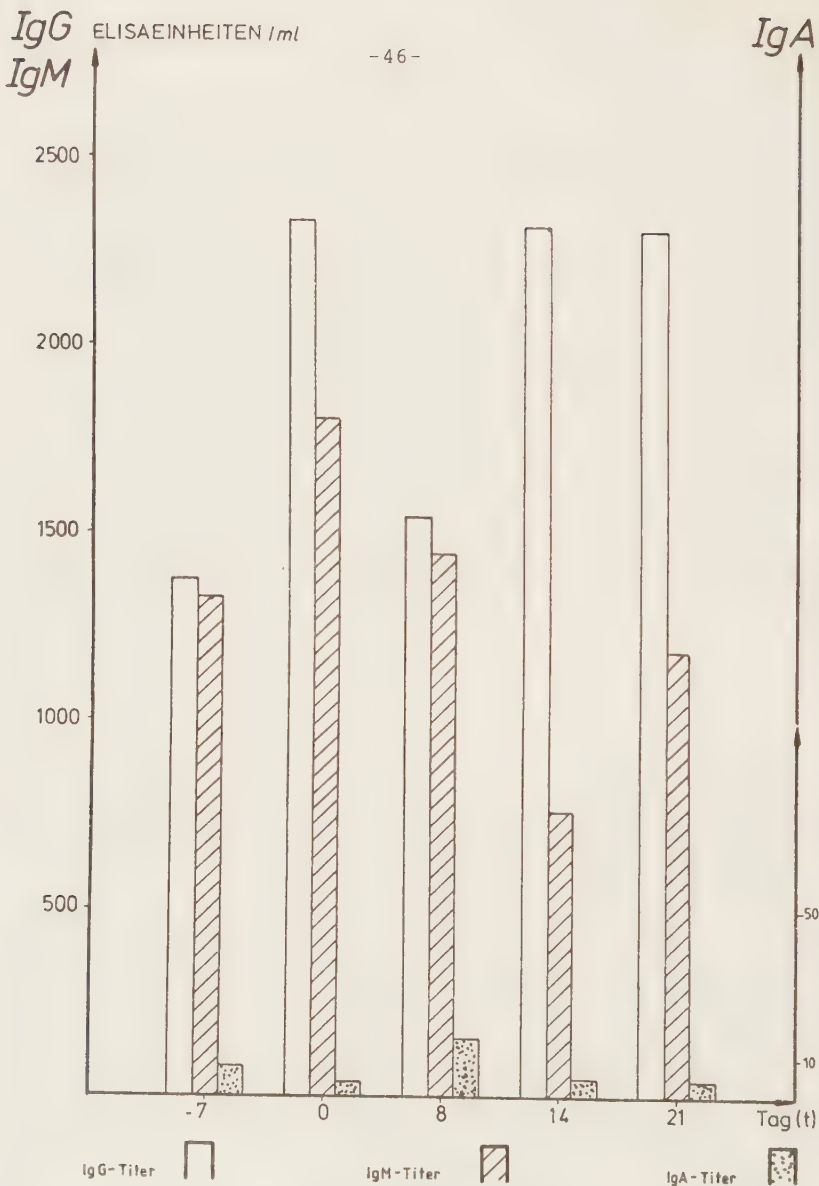


Abb.17 Anti-DNP Antikörpertiter (Elisaeinheiten/ml) von Kontrolltieren der Gruppe DNP II-Häm2 nach Vorimmunisierung mit 0,4 μ g/kg KG Häm am Tag -7 und Immunisierung mit 0,5 mg/kg KG DNP-Häm am Tag 0.

n und s siehe Tab. 16, 17 und 18

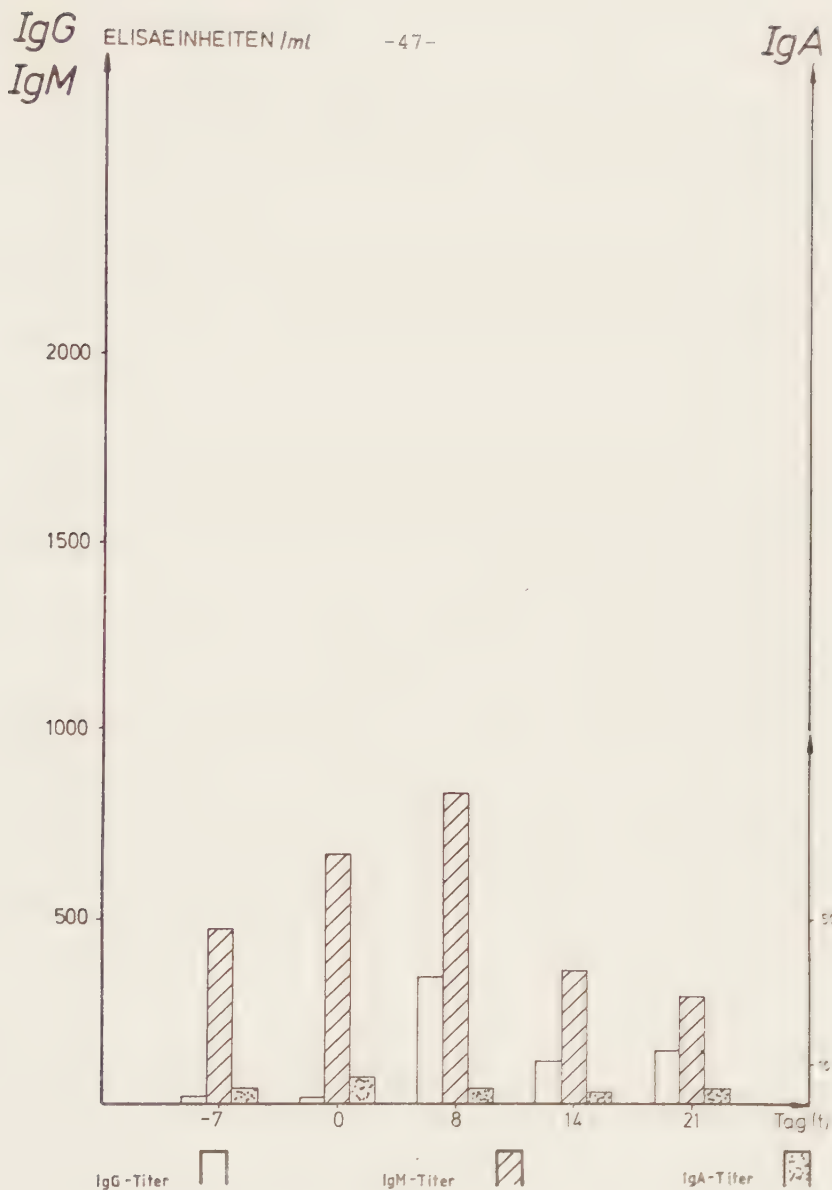


Abb.18 Anti-DNP Antikörpertiter (Elisaeinheiten/ml) von dysgammaglobulinämischen Hühnern der Gruppe DNP II-Häm2 nach Vorimmunisierung mit 0,4 µg/kg KG Häm am Tag -7 und Immunisierung mit 0,5 mg/kg KG DNP-Häm am Tag 0.

n und s siehe Tab. 16, 17 und 18

Bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern reagierten lediglich die Tiere 3212 und 3209 mit einer geringgradigen IgG-Antikörperproduktion.

3.6 Anti- DNP-Antikörper nach Vorimmunisierung mit Trägerprotein und anschließender Behandlung mit DNP-Carrier bei gleichzeitiger Verabreichung von Levamisol

3.6.1 DNP III - HSA, DNP III - Häm 1 und DNP III - Häm 2

Bei diesen Tiergruppen wurde versucht durch Verabreichung von Levamisol die dysgammaglobulinämischen Hühner zur IgG-Antikörperproduktion zu stimulieren, da angenommen wird, daß der Defekt durch ein gestörtes T-Helfer-T-Suppressor-Zellverhältnis verursacht werden kann.

Wie aus den Abb. 19,20 und 21 und den Tab. 19 bis 22 zu ersehen ist, reagierte keines der Tiere auf die Immunisierung mit der Produktion von IgG-Antikörpern.

Auch die haptenspezifische IgM- und IgA-Synthese erreichte nicht die Werte der vorher genannten Vergleichsgruppe ohne Levamisolverabreichung. Lediglich das Huhn 3282 der Gruppe DNP III - Häm 1 (Vorimmunisierung mit 0,4 ug/kg Körpergewicht Hämocyanin; Immunisierung mit 5 mg/kg Körpergewicht DNP-Hämocyanin und 2,5 mg/kg Körpergewicht Levamisol) wies eine deutliche Steigerung der IgA-Antikörperproduktion auf (Tab. 21).

3.7 Statistische Auswertung

Aufgrund der starken individuellen Schwankungen innerhalb der einzelnen untersuchten Gruppen konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchstiergruppen an den entsprechenden Blutentnahmetagen festgestellt werden.

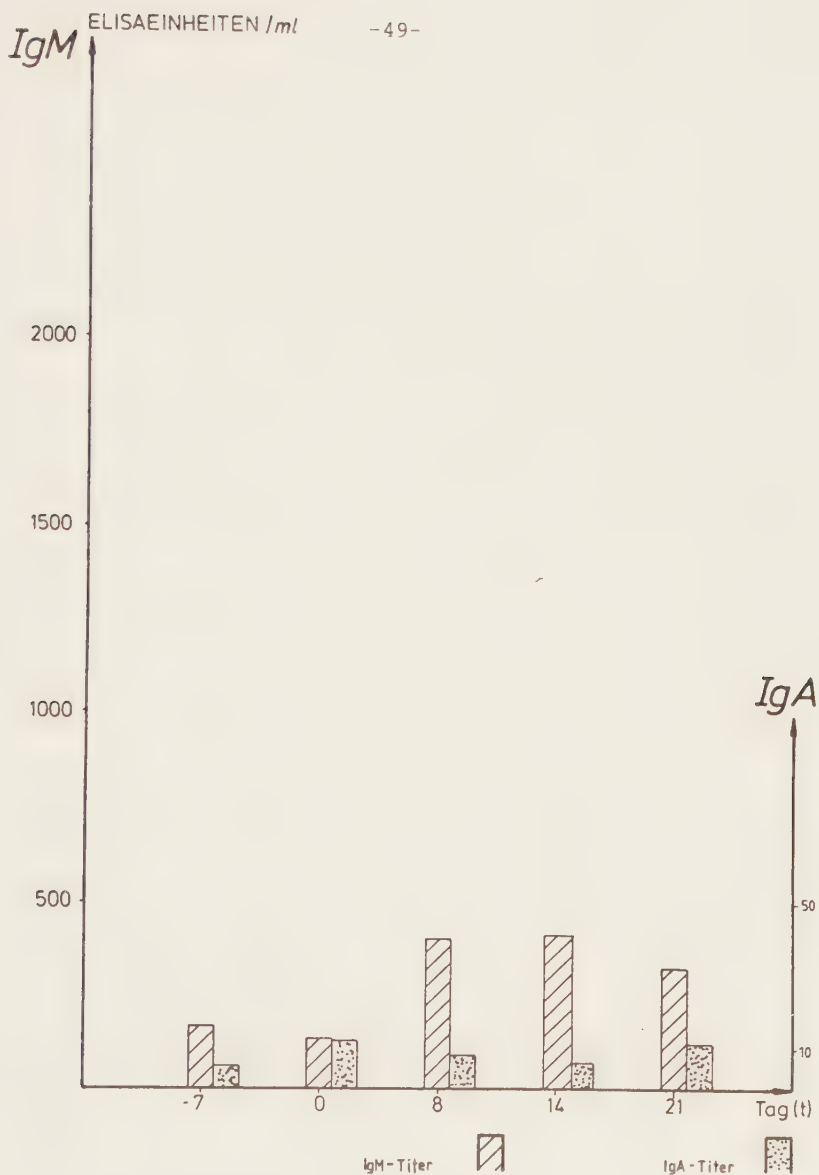


Abb.19 Anti-DNP Antikörpertiter (Elisaeinheiten/ml) von dysgammaglobulinämischen Hühnern der Gruppe DNP III-HSA nach Vorimmunisierung mit 0,4 µg/kg KG HSA am Tag -7 und Immunisierung mit 20 mg/kg KG DNP-HSA und 0,25 mg/kg KG Levamisol am Tag 0.

n und s siehe Tab. 22 und 23



Abb. 20 Anti-DNP Antikörpertiter (Elisaeinheiten/ml) von dysgammaglobulinämischen Hühnern der Gruppe DNP III-Häm1 nach Vorimmunisierung mit 0,4 µg/kg KG Hämocyanin am Tag -7 und Immunisierung mit 5 mg/kg KG DNP-Häm und 0,25 mg/kg KG Levamisol am Tag 0.

n und s siehe Tab. 19, 20 und 21

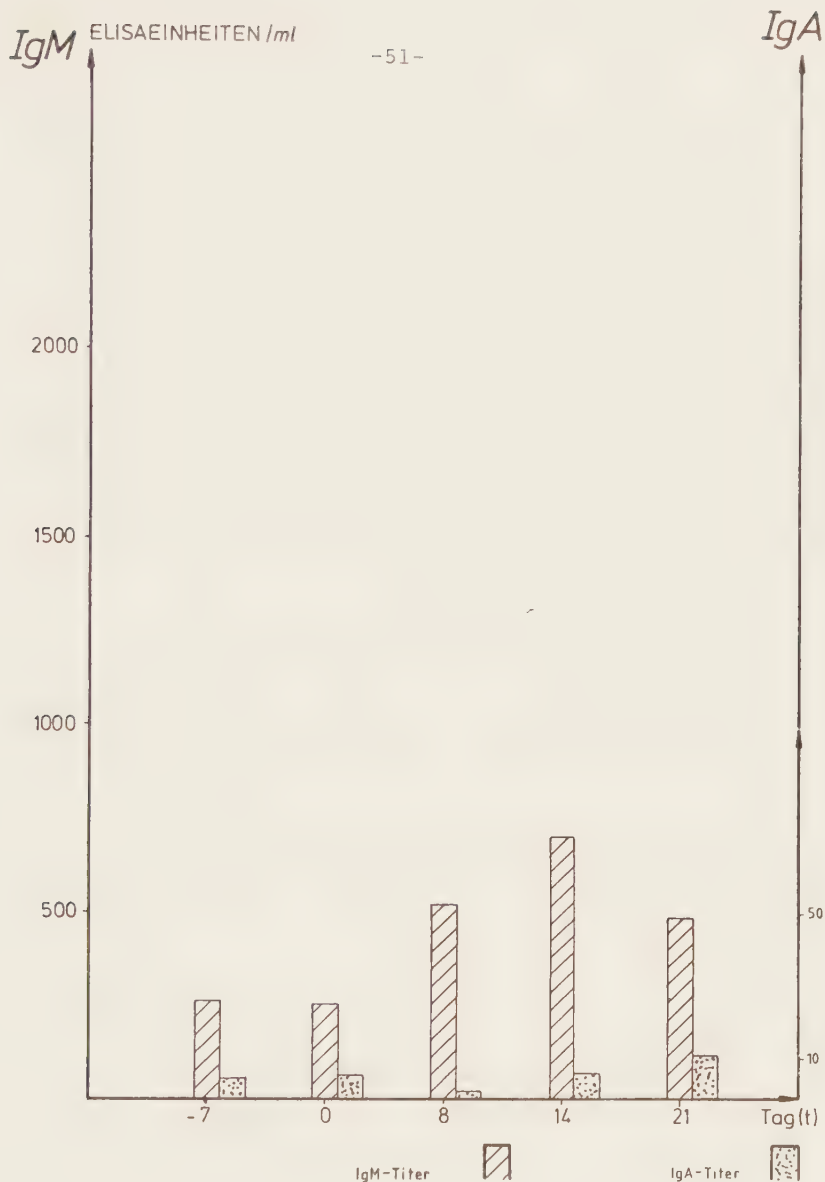


Abb.21 Anti-DNP Antikörpertiter (Elisaeinheiten/ml) von dysgammaglobulinämischen Hühnern der Gruppe DNP III-Häm2 nach Vorimmunisierung mit $0,4 \mu\text{g/kg}$ KG Hämocyanin am Tag -7 und Immunisierung mit $0,5 \text{ mg/kg}$ KG DNP-Häm und $0,25 \text{ mg/kg}$ KG Levamisol am Tag 0.

n und s siehe Tab. 19, 20 und 21

3.8 Indirekter Elisa zum Nachweis der carrier-spezifischen Antikörper

Die isotypspezifische Bestimmung der anti-HSA und anti-Hämocyanin IgG-Antikörper der dysgammaglobulinämischen Hühner wurde mittels des indirekten Elisa durchgeführt. Die Platten wurden mit 50 µg Hämocyanin bzw. 100 µg HSA pro ml Beschichtungspuffer inkubiert und anschließend wie bei Kühlmann - Rabens et al. (49) beschrieben, behandelt.

Beim Vergleich dieser Ergebnisse mit den vorher durchgeführten Elisas fiel auf, daß nur dann eine Anti-Hapten IgG-Antikörperproduktion feststellbar war, wenn gleichzeitig auch eine Anti-Carrier-Antikörperproduktion stattgefunden hatte.

4. Diskussion

4.1 Besprechung der Methoden

Zur Bestimmung, Lokalisierung und Quantifizierung biologischer Bestandteile wurden bisher verschiedene serologische Methoden entwickelt, bei denen markierte Antigene oder Antikörper verwendet wurden. Diese Techniken beruhen auf der hohen Spezifität und Empfindlichkeit der Antigen-Antikörper-Reaktion.

Yalow und Berson (100) entwickelten 1959 den Radioimmunoassay (RIA) indem sie sich die Markierung mit Radioisotopen zunutze machten. Da der RIA mit einigen Nachteilen, wie geringen Halbwertszeiten der Marker-Isotope, hohen Sicherheitsvorkehrungen und teuren Gerätschaften (70) behaftet ist, wurden verschiedene nicht radioaktive Marker untersucht, um die Vorteile der Spezifität und Sensitivität des Immunoassays zu bewahren, ohne dabei mit Radioisotopen arbeiten zu müssen (1,37,54,82,87).

Seit seiner Einführung durch Engvall und Perlmann (25) und durch van Weeman und Schuurs (98) hat der Elisa (enzyme linked immunosorbent assay) große Bedeutung erlangt. Die Elisasyysteme werden sowohl zum Nachweis von Antigenen (10,12,27,61,76) als auch von Antikörpern (28,83,96) eingesetzt.

Im Vergleich zu älteren Methoden wie der Agglutination, quantitativen Präzipitation, passiven Hämagglutination, Immunofluoreszenz und Komplementfixierung erwies sich der Elisa als überaus sensitiv (6,96) und als gleichwertig zum RIA (28).

Weiterhin bietet diese Technik die Möglichkeit, Antikörperisotypen (IgG-, IgM-, IgA- Antikörper) in unfraktionierten Seren getrennt bestimmen zu können (25,26,36,95).

Es lassen sich direkte (42), indirekte (25), kompetitive

(42,70), nicht kompetitive Elisias (79) und Sonderformen wie der Sandwich-Elisa (7) unterscheiden.

Gerade zum Nachweis niedermolekularer Substanzen wie biologischer und chemischer Toxine (44,45,55,73) oder Drogen und Hormone, die als Haptene an Carrierproteine gekoppelt immunologisch wirksam sind (99), oder zum Nachweis von Antikörpern gegen diese Substanzen (26,44,45) hat sich der indirekte Elisa als geeignetes Detektionssystem erwiesen.

Solche Systeme, bei denen meist die Beschichtung der Polystyrolplatten mit Hapten-Carrier-Komplexen durchgeführt wird, sind aber sehr anfällig gegen haptenunspezifische Reaktionen der Antikörper mit dem Carrier oder mit neuen antigenen Determinanten, die nach der Kopplung des Haptens mit dem Trägerprotein entstehen können (45).

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb die Antikörper gegen DNP nicht aufgrund ihrer bloßen Bindungskapazität an den Hapten-Proteinkomplex der beschichteten Elisaplatte bestimmt, sondern indirekt über die Hemmung der Antikörperaktivität mit freiem Hapten. Gerade die Hemmbarkeit der Antikörperaktivität durch freies Hapten ist ein entscheidendes Kriterium für die Spezifität beim Hapten-Elisa (18).

Wie Abb. 4 zeigt, ist dabei zur 50%igen Hemmung der IgM-Antikörper eine sehr viel höhere DNP-Konzentration nötig, als zur Hemmung der IgG- bzw. IgA-Antikörper (Abb. 3 und 5). Dies ist wohl auf die geringere Affinität der IgM-Antikörper zurückzuführen (49).

Auch die relativ hohen DNP-Konzentrationen, die insgesamt notwendig sind um eine Hemmung der Antikörperaktivität zu erreichen, sind in der geringeren Affinität der Antikörper zum freien als zum proteingebundenen Hapten zu suchen (18,26,97).

Obwohl die 50%ige Hemmung der Antikörperaktivität mit der gewählten Haptenkonzentration in den Standards auch bei verschiedenen Antikörperkonzentrationen konstant verlief (Abb.6)

besteht dennoch die Gefahr, daß bei der Untersuchung von Proben mit unterschiedlichen Antikörperaffinitäten geringgradige Ungenauigkeiten auftreten können. Ungenauigkeiten aufgrund unterschiedlicher Antikörperaffinitäten sind aber beim empfindlichen Elisasytem nie auszuschließen (53,60,72). Demgegenüber stand in der vorliegenden Arbeit der Gewinn an Spezifität durch die kompetitive Hemmung.

4.2 Besprechung der Ergebnisse

Mit Hilfe dieses Elisasytems sollte die Immunantwort von dysgammaglobulinämischen Hühnern auf die Immunisierung mit DNP-Carrierkomplexen untersucht werden. Von besonderem Interesse war dabei, ob mit Carriervorimmunisierung oder mit Verabreichung von LPS und Levamisol diese Hühner zur Bildung haptenspezifischer IgG-Antikörper angeregt werden können. Als Kontrolle dienten immunologisch unauffällige HNL-Leghorn-Hühner.

Dabei zeigte sich (siehe Abb. 7-12, Tab. 1-9 DNP I-Gruppen), daß bei den Hühnern die Antihaptenantwort nach Immunisierung mit Hapten-Carrierkomplexen ähnlich ablief, wie bei früheren Untersuchungen die Immunantwort auf das T-zellabhängige Antigen HSA (49).

So kam es innerhalb der ersten beiden Wochen zu einem starken Anstieg der IgG-, IgM-, und IgA-Antikörper, deren Konzentrationen ohne Boosterung dann allmählich wieder absanken. Die dysgammaglobulinämischen Tiere waren dabei, bis auf wenige Ausnahmen (2633,2891,3125,3132,3137) nicht in der Lage, IgG-Antikörper zu synthetisieren.

Bei den Tieren 2633 und 3137 stellte sich heraus, daß sie im Verlauf der Untersuchungen in die transitorische Form der Dysgammaglobulinämie übergingen (siehe Einleitung).

Die IgA-Antikörpertiter waren insgesamt sehr niedrig und übertrafen bei den dysgammaglobulinämischen Tieren, wie nach Immunisierung mit HSA (49), die der Kontrolltiere.

Auffällig waren die relativ hohen Präimmuntiter, vor allem die IgM-Titer bei allen untersuchten Tiergruppen. Dies ist wohl auf das Vorhandensein natürlicher Anti-DNP-Antikörper zurückzuführen. Das Vorkommen natürlicher Anti-Hapten-Antikörper, die hauptsächlich vom IgM-Typ sind, wurde auch bei anderen Tierarten und beim Menschen beschrieben (41).

Möglicherweise sind darauf auch die relativ hohen IgM-Antikörperkonzentrationen der Kontrolltiere zurückzuführen, die häufig sogar im Größenbereich der IgM-Antikörpertiter der dysgammaglobulinämischen Tiere lagen.

Darüber hinaus wurde versucht, durch mehrmalige Verabreichung von LPS ab dem 42. Tag nach der Immunisierung die Antikörperantwort insgesamt zu steigern und die dysgammaglobulinämischen Hühner zur Produktion von IgG-Antikörpern anzuregen.

LPS gilt als wirksames B-Zellmitogen bei Säugetieren (58) und bei Hühnern (38). So soll es sowohl bei dysgammaglobulinämischen Hühnern (49) als auch bei thymuslosen Nacktmäusen (40) zur Stimulierung des B₉-Zellpools geeignet sein.

Obwohl Einzeltiere (siehe Tabb.1-9) auf die LPS-Verabreichung mit einer gesteigerten Antikörperproduktion reagierten, ist es in keinem Fall gelungen, die dysgammaglobulinämischen Tiere zu vermehrter IgG-Antikörpersynthese anzuregen. Da in früheren Untersuchungen, bei denen LPS stets gemeinsam mit dem Antigen verabreicht worden war, keine Dosis-Wirkungskorrelation bei Hühnern festgestellt werden konnte (49), wurde in den vorliegenden Versuchen die sehr niedrige LPS-Dosis von 5 µg/kg Körpergewicht gewählt. Möglicherweise zeigen aber niedrige LPS-Dosen auch beim Huhn nur in Kombination mit dem Antigen eine spezifische B-Zellwirkung, wie dies beim Säuger offensichtlich der Fall ist (19).

Es wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit versucht, durch Vorimmunisierung mit Proteincarrier einen näheren Einblick in das Zusammenspiel der unterschiedlichen Lymphozytensubpopulationen zu erhalten.

Bei Haptenträgerkomplexen unterscheidet man T-zellunabhängige und T-zellabhängige Konjugate, wobei sich die Qualität der Immunantwort nach der Spezifität des Carriers richtet (16,17).

DNP-HSA und DNP-Hämocyanin stellen typische T-zellabhängige Antigene dar. Aus vielen Untersuchungen ist bekannt, daß bei T-zellabhängigen Hapten-Proteinkonjugaten durch Vorimmunisierung mit Carrierprotein, sowohl die Primär- als auch die Sekundärantwort auf das Hapten gesteigert werden kann (43,78,95).

Dies wird allgemein auf die Kooperation zwischen carrierspezifischen T-Zellen und haptenspezifischen B-Zellen zurückgeführt (14,17,43,50,71,78,85,90), wobei eine gesteigerte T-Helferzellaktivität vermutet wird (64,78).

Die hier verwendete Konzentration von 0,4 µg Trägerprotein pro kg Körpergewicht wurde deshalb gewählt, weil Sarvas et al. (78) beim Huhn eine optimale Stimulierung nur mit sehr niedrigen Carrierkonzentrationen erhalten konnten.

Wie die Ergebnisse zeigen (Tab. 10; Abb. 13 und 14), konnte gerade bei der Vorimmunisierung mit HSA (Gruppe DNP II HSA), eine deutliche Stimulierung der B_G-Zellen beobachtet werden. So wurden bei den immunologisch intakten Kontrolltieren die höchsten IgG-Titer überhaupt erreicht (Abb. 13, Tab. 10).

Auch bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern konnte 8 Tage nach der Immunisierung eine starke haptenspezifische IgG-Antikörperbildung beobachtet werden (Abb. 14, Tab. 10).

Trotz der deutlichen Unterschiede in der Ausbildung der IgG-Antikörpertiter zwischen den mit HSA vorimmunisierten und nicht vorimmunisierten Tieren konnte mit dem Student's T-Test

keine statistische Signifikanz ($p > 0,05$) festgestellt werden. Dies ist auf die sehr hohe Standardabweichung zurückzuführen, die durch das Nichtreagieren der Tiere 3100 und 3104 hervorgerufen wird.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich ableiten, daß die B_G -Zellen der dysgammaglobulinämischen Tiere durchaus zur IgG-Antikörperproduktion befähigt sind.

Voraussetzung dafür scheint allerdings eine genügend hohe T-Helferaktivität zu sein. Möglicherweise liegt bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern aber ein gestörtes T-Helfer-T-Suppressor-Verhältnis vor, so daß erst nach zusätzlicher Stimulierung der T-Zellhilfe eine ähnliche Immunantwort erhalten werden kann wie bei immunologisch intakten Hühnern. Ähnliche Ergebnisse wurden in früheren Untersuchungen mit Levamisol erzielt, dem eine regulierende Funktion bei gestörtem T-Helfer-Suppressor-Verhältnis zugeschrieben wird (49). Auf die grundsätzliche Ansprechbarkeit des B_G -Zellpools bei dysgammaglobulinämischen Hühnern weist auch die Möglichkeit der Stimulierung mit LPS bei gleichzeitiger Antigenverabreichung hin (49).

Die mit HSA als Carrier erreichten Effekte konnten allerdings mit Hämocyanin weder bei den Kontrolltieren noch bei den dysgammaglobulinämischen Tieren reproduziert werden.

Aus der Literatur ist bekannt, daß gerade der Konzentration des Carriers bei der Vorimmunisierung eine entscheidende Bedeutung zukommt um eine optimale Immunreaktion zu erhalten (43).

So konnten Chan und Henry (14) durch Variieren der Carrierkonzentration bei der Vorimmunisierung T-Helfer- und T-Suppressorzellen in unterschiedlichem Ausmaß stimulieren.

Möglicherweise wurde mit der hier gewählten Hämocyaninkonzentration keine genügende T-Helferzellaktivierung erreicht. Einige Autoren beschreiben sogar eine gesteigerte T-zellver-

mittelte Suppression nach Carriervorimmunisierung (22,24,68). Ebenso wie die Tiere der mit Hämocyanin vorbehandelten Gruppen zeigten aber auch die Tiere 3100 und 3104 (Tab. 10) trotz Vorimmunisierung mit HSA keine oder nur vorübergehende IgG-Antikörpersynthese. Bei beiden Hühnern konnten aber auch -wie nach Vorimmunisierung mit Hämocyanin - keine carrierspezifischen IgG-Antikörper nachgewiesen werden.

Das Fehlen einer anti-Haptenantwort bei gleichzeitigem Fehlen einer anti-Carrierantwort, welche unter anderem durch Toleranzinduktion hervorgerufen wird, ist auch aus der Literatur bekannt (43).

Immunologische Toleranz wird auch bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern der UM-B19 Linie als mögliche Defektursache diskutiert (49). Dabei wird als Auslöser der klonalen B_G Zellrestriktion eine Verzögerung der Bursaentwicklung vermutet (49,56), wobei die in der Reifung befindlichen B_G-Zellen besonders anfällig gegenüber einer Toleranzinduktion sein sollen.

Eine gestörte Bursaentwicklung wurde auch bei den UCD-140 Hühnern beobachtet (29).

Eine erhöhte T-Zell-Suppression, die bei den Hühnern der UCD-140 Linie nachgewiesen werden konnte (15), wird auch bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern der UM-B19 Linie vermutet (49).

Aus Bursektomieexperimenten ist bekannt, daß eine Restriktion der B-Zellpopulation eine isotypspezifische T-Suppression hervorrufen kann (15).

Eine Toleranzinduktion wird ebenfalls gegenüber Haptenen beschrieben, die entweder durch die Verabreichung tolerogener Dosen von Hapten-Proteinkomplexen (46), von freiem Hapten (39) oder von Hapten gekoppelt an syngene Zellen (62,65) provoziert werden kann. Die hier vorliegenden Ergebnisse bei der Vorimmunisierung mit HSA stimmen mit den Resultaten von

Huchet und Grandjon (39) überein, welche durch Carriervorimmunisierung eine Haptentoleranz durchbrechen konnten. Die dadurch erreichte Steigerung der T-Zellhilfe soll dabei die spezifischen B-Zellfunktionen wieder in Gang setzen.

Im Gegensatz dazu scheint bei den Tieren, die trotz Carriervorimmunisierung weder eine carrier- noch eine haptenspezifische IgG-Antikörperproduktion zeigten, ein vollkommenes Fehlen spezifischer B_G-Klone möglich zu sein. Eine klonale Eliminierung wird häufig als Toleranzursache angeführt(31,67).

Eine weitere Möglichkeit der Behebung einer gestörten B-Zell-T-Zell-Kooperation ist die Verabreichung von Levamisol (20,66,89).

In der vorliegenden Arbeit konnten die dysgammaglobulinämischen Hühner aber weder zur carrier- noch zur haptenspezifischen IgG-Produktion veranlaßt werden (siehe Gruppe DNP III, Abb. 19-21, Tab. 19-23).Möglicherweise zeichnen sich die hier untersuchten Tiere durch das Fehlen der spezifischen B_G-Zellklone aus. Außerdem werden sowohl beim Säuger (89) als auch bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern (49) sogenannte non-responder Tiere, die nicht auf die Verabreichung von Levamisol reagieren, beschrieben.

Zusammengefaßt unterstützen die vorliegenden Ergebnisse die schon früher aufgestellte Vermutung (49), daß eine immunologische Toleranz als mögliche Defektursache der Dysgammaglobulinämie der UM-B19 Linie in Frage kommen kann.

Ähnlich wie beim Säuger (65) scheint diese Toleranz durch das Vorhandensein vermindelter T-Helfer- oder erhöhter T-Suppressoraktivität sowie einer klonalen Elimination verursacht zu werden.

Die Korrelation zwischen anti-Carrier- und anti-Hapten-IgG Antikörperproduktion der dysgammaglobulinämischen Hühner lassen vermuten, daß dabei hauptsächlich die carriersensiblen B_G-Zellen betroffen sind.

5. Zusammenfassung

Zur Bestimmung der haptenspezifischen Antikörper wurde ein kompetitiver Elisa entwickelt.

Die kompetitive Hemmung der Antikörper wurde durch Zugabe von freiem Hapten zum Verdünnungspuffer (PBS-Tween) erreicht.

Das entwickelte Nachweissystem erfaßt somit ausschließlich die haptenspezifischen Antikörper, nicht aber die gegen die Bindungsstelle und "Spacer" des Hapten-Proteinkomplexes.

Untersucht wurde die Beeinflussung des Immunsystems dysgamma-globulinämischer Hühner der Linie UM-B19 sowie von Kontrollhühnern durch proteingebundenes Hapten am Beispiel des Dinitrophenyls (DNP) gekoppelt an Humanserumalbumin und Hämocyanin.

Ein Teil der Tiergruppen wurde mit dem jeweiligen Trägerprotein vorimmunisiert.

Die Immunmodulation durch LPS und Levamisol wurde ebenfalls untersucht. Mit dem entwickelten kompetitiven Elisa wurden die Serumproben isotypspezifisch auf ihren Gehalt an IgG-, IgM- und IgA-Antikörpern untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Anti-Hapten-Antwort der dysgamma-globulinämischen Hühner und der Kontrollhühner ähnlich verläuft wie gegen reine Proteinträger.

Der Einsatz von LPS und Levamisol zeigte keine stimulierende Wirkung auf die IgG-Antikörpersynthese der dysgamma-globulinämischen Hühner.

Bei Vorimmunisierung der Tiere kam es bei einigen Hühnern zu einer starken Steigerung der IgG-Antikörperproduktion. Eine Verbindung zwischen der hapten- und der carrierspezifischen Immunreaktion konnte dabei ebenfalls festgestellt werden.

Die erhaltenen Ergebnisse werden im Zusammenhang mit dem Phänomen der immunologischen Toleranz als mögliche Ursache der Dysgamma-globulinämie der UM-B19 Hühner diskutiert.

6. Summary

Examination of the antibody response of various chicken lines by means of a hapten specific Elisa system

A competitive Elisa system was developed to determine hapten-specific antibodies.

The competitive inhibition of antibodies was achieved by adding free hapten to the dilution buffer (PBS-Tween).

The system developed detects only the hapten-specific antibodies, but not the antibodies against the binding sites and spacer of the hapten-protein complex.

Protein-bound hapten, in this case dinitrophenol (DNP) coupled to human serum albumin (HSA) and hemocyanin, were investigated with regard to their influence on the immune system of UM-B19 dysgammaglobulinemic chickens and control chickens. Some of the animals were preimmunized with the respective carrier protein.

The immunomodulation of LPS and Levamisol was also investigated.

Serum concentrations of IgG-, IgM- and IgA-isotypes were determined by this competitive Elisa system.

The results show that the anti-hapten response is similar to that against pure protein antigens, in both the dysgammaglobulinemic and the control chickens.

Treatment with LPS and Levamisol showed no stimulating effect on IgG-antibodyproduction in dysgammaglobulinemic chickens.

Preimmunization produced an increase in antigen specific IgG antibodies in some chickens. A connection between hapten specific and carrier specific immune reaction could also be shown.

The results are discussed in context of the phenomena of immunological tolerance as a possible cause of dysgammaglobulinemia in UM-B19 chickens.

7. Tabellarischer Anhang

Tiernr.	Tage nach Immunisierung									
	0	8	14	21	42	49	56	63	105	112
Kontrollhühner										
421	15	1271	570	219	34	13	14	12	23	0
425	278	4056	1608	761	1154	1180	759	469	348	1962
426	4247	17952	3102	5495	1348	1054	1657	2258	214	1740
653	992	10213	3000	6175	1595	1210	156	1341	228	948
660	220	4768	5097	883	669	6636	2883	3842	14658	5975
661	390	1490	1732	6429	6546	1380	857	956	857	956
$\bar{x}$	1024	6625	2518	3327	1891	1912	1054	1480	2721	1930
s	1613	6423	1579	2988	2347	2365	1070	1390	5855	2099
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Dysgammaglobulinämische Hühner										
2601	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2633	0	4868	11966	2042	251	248	94	18	45	30
2891	0	472	56	0	0	0	0	0	0	0
3165	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3174	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3199	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$\bar{X}$	0	890	2004	340	42	41	16	3	8	5
s	0	1958	4881	834	102	101	38	7	18	12
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Tab.1 IgG-Anti-DNP-Titer (Elisaeinheiten/ml) der Gruppe DNPI-HSA nach Immunisierung mit 20 mg/kg DNP-HSA am Tag 0. Jeweils 5 µg/kg KG LPS an den Tagen 42,63 und 105.

Tiernr.	Tage nach Immunisierung									
	0	8	14	21	42	49	56	63	105	112
Kontrollhühner										
421.	68	2401	6347	1872	1993	1594	1677	1492	2196	2817
425	169	736	274	714	665	857	888	680	917	531
426	596	654	2808	1816	1007	1478	1665	745	1427	813
653	688	286	56	1243	242	395	287	293	0	845
660	1013	317	315	357	603	636	391	398	142	802
661	642	0	1123	1571	2054	230	640	498	264	170
$\bar{x}$	529	732	1821	1262	1094	865	925	684	821	996
s	352	860	2438	615	760	563	614	430	862	928
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Dysgammaglobulinämische Hühner										
2601	854	3319	2057	910	5	547	975	1916	1273	2131
2633	140	965	326	614	13	67	776	1577	342	316
2891	449	1836	365	448	325	64	545	698	438	560
3165	182	112	86	288	126	88	12	10	0	0
3174	581	2484	1037	316	335	183	688	749	167	
3199	70	397	297	611	499	69	151	89	355	209
$\bar{x}$	379	1519	695	531	217	170	525	840	429	643
s	304	1250	741	232	200	190	373	772	442	856
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5

Tab.2 IgM-Anti-DNP-Titer (Elisaeinheiten/ml) der Gruppe DNPI-HSA nach Immunisierung mit 20 mg/kg KG DNP-HSA am Tag 0. Jeweils 5 µg/kg KG LPS an den Tagen 42,63 und 105.

Tierrrr.	Tage nach Immunisierung									
	0	8	14	21	42	49	56	63	105	112
Kontrollhühner										
421	9	29	0,5	3	4	3	6	4	5	3
425	0	0,9	2	1	2	3	3	3	9	6
426	0,3	1	0,9	5	5	2	2	2	0,9	5
653	0	2	1	0,8	0,6	3	1	0,9	0	0
660	0,3	2	3	2	0,8	1	2	5	1	1
661	4	2	0,8	3	4	1	1	2	2	0,6
$\bar{x}$	2	6	1	2	3	2	3	3	3	3
s	4	11	1	2	2	1	2	1	3	2
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Dysgammaglobulinämische Hühner										
2601	3	7	5	12	18	49	16	5	15	18
2633	8	36	9	3	0,2	3	8	5	1	5
2891	19	29	9	40	12	38	10	31	13	1
3165	3	7	0	0	0	0	0	0	0	0,5
3174	0	0,5	0	2	19	1	1	6	5	6
3199	0	0	4	1	0	1	0,2	0,8	2	5
$\bar{x}$	6	13	5	10	8	15	6	8	6	6
s	7	15	4	15	9	22	7	12	6	6
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Tab. 3 IgA-Anti-DNP-Titer (Flisaeinheiten/ml) der Gruppe DNPI-HSA nach Immunisierung mit 20 mg/kg KG DNP-HSA am Tag 0. Jeweils 5 µg/kg KG LPS an den Tagen 42, 63 und 105.

Tierart.	Tage nach Immunisierung									
	0	8	14	21	42	49	56	63	105	112
Kontrollhühner										
413	0	115	191	62	14	12	0	29	4	663
414	594	3224	282	888	310	862	1512	1970	3970	7742
415	325	139	222	513	299	179	74	262	2631	2684
654	254	1823	439	838	600	964	2581	2588	945	1288
1157	472	9123	19818	3431	951	815	31	838	221	303
1159	3849	2782	2507	4165	10799	3179	1926	5920	806	3377
$\bar{x}$	916	2868	3910	1650	2162	1002	1021	1935	1430	2676
s	1451	3328	7844	1706	4243	1136	1133	2188	1550	2748
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Dysgammaglobulinämische Hühner										
3125	0	377	654	187	29	58	53	58	8	0
3132	0	1542	1707	192	0	0	0	0	0	0
3137	226	2192	519	1173	2481	1075	2351	1320	781	3292
3138	0	0	0	44	22	29	37	0	0	0
3145	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3146	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$\bar{x}$	38	685	480	266	422	194	407	230	132	549
s	92	950	668	453	1009	432	953	535	318	1344
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Tab.4 IgG-Anti-DNP-Titer (Elisaeinheiten/ml) der Gruppe DNPI-IIäm1 nach Immunisierung mit 5 mg/kg KG DNP-IIäm am Tag 0. Jeweils 5 µg/kg KG LPS an den Tagen 42,63 und 105.

Tiernr.	Tage nach Immunisierung									
	0	8	14	21	42	49	56	63	105	112
Kontrollhühner										
413	3396	8042	2977	2979	1832	1177	1193	2138	942	539
414	531	281	100	286	216	401	487	775	539	684
415	280	580	568	645	474	364	714	108	509	908
654	192	796	138	155	149	434	5153	1019	196	102
1157	742	2539	2320	1751	880	641	1912	2733	1798	910
1159	1406	6197	3337	4474	2978	3001	804	1716	1329	1674
$\bar{x}$	1091	3073	1573	1715	1088	1003	1711	1415	886	803
s	1209	3284	1475	1722	1112	1024	1759	962	595	521
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Dysgammaglobulinämische Hühner										
3125	218	668	387	191	107	225	68	121	121	856
3132	301	1944	1445	195	272	398	397	429	440	675
3137	1249	2412	1753	3942	5851	6732	4322	1827	2292	1408
3138	1830	2628	3062	496	1010	108	1084	2084	3730	340
3145	528	855	599	406	367	899	585	382	220	1788
3146	89	150	96	478	123	276	190	153	306	28
$\bar{x}$	703	1443	1224	951	1288	1440	1108	833	1185	849
s	689	1021	1102	1471	2260	2607	1615	882	1490	657
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Tab.5 IgM-Anti-DNP-Titer (Elisaeinheiten/ml) der Gruppe DNPI-IIämI nach Immunisierung mit 5 mg/kg KG DNP-IIäm am Tag 0. Jeweils 5 ug/kg KG LPS an den Tagen 42, 63 und 105.

Tiernr.	Tage nach Immunisierung									
	0	8	14	21	42	49	56	63	105	112
Kontrollhühner										
413	13	22	2	0,1	4	15	17	22	9	50
414	0	0	0	0,8	1	1	2	5	2	200
415	0	0,2	0	2	2	0,8	5	2	0,7	1
654	0	1	3	0	0	0	0	0	0	2
1157	9	32	8	11	5	8	6	9	7	164
1159	9	15	7	15	1	11	10	0,5	10	0
$\bar{x}$	5	12	3	5	2	6	7	6	5	70
s	6	14	3	7	2	6	6	8	4	90
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Dysgammaglobulinämische Hühner										
3125	0,9	41	34	15	22	27	14	21	35	90
3132	8	11	9	21	15	12	16	12	33	581
3137	39	37	314	565	466	165	54	149	62	433
3138	10	7	53	4	0,8	3	1	9	373	123
3145	11	8	2	5	0,8	1	0,7	8	1	7
3146	149	14	64	34	4	17	6	6	0,9	0,2
$\bar{x}$	36	20	79	107	85	38	15	34	84	206
s	57	15	117	224	187	63	20	57	143	243
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Tab.6 IgA-Anti-DNP-Titer (Elisaeinheiten/ml) der Gruppe DNPI-Häm1 nach Immunisierung mit 5 mg/kg KG DNP-Häm am Tag 0. Jeweils 5 µg/kg KG LPS an den Tagen 42, 63 und 105.

Tiernr.	Tage nach Immunisierung									
	0	8	14	21	42	49	56	63	105	112
Kontrollhühner										
656	1272	2900	125	4373	2488	2850	441	493	2638	2351
657	1855	9904	1340	9517	9832	2318	382	2562	3084	2108
658	4249	6150	2509	4040	2682	769	2105	318	1568	546
659	4493	17949	28961	4103	1391	4877	4000	9728	2101	2964
663	11762	10185	6517	7139	2368	814	795	1102	2066	1754
665	1405	150	4173	1087	1023	758	228	10609	1197	889
$\bar{x}$	4173	7873	7271	5052	3297	2064	1325	4135	2119	1769
σ	3979	6298	10859	2919	3268	1646	1478	4748	687	911
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Dysgammaglobulinämische Hühner										
3105	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3218	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3219	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3224	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3236	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3240	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$\bar{x}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
σ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Tab.7 IgG-Anti-DNP-Titer (Elisaeinheiten/ml) der Gruppe DNPI-Häm2 nach Immunisierung mit 0,5 mg/kg KG DNP-Häm am Tag 0. Jeweils 5 µg/kg KG LPS an den Tagen 42, 63 und 105.

Tiernr.	Tage nach Immunisierung									
	0	8	14	21	42	49	56	63	105	112
Kontrollhühner										
656	127	582	160	261	838	1235	286	324	463	650
657	586	1249	1019	294	263	310	147	196	109	174
658	607	1252	709	1668	760	3558	248	267	291	244
659	259	974	642	498	385	436	75	84	50	30
663	358	484	31	763	1370	689	799	1334	665	242
665	351	360	406	510	743	476	422	1363	753	340
$\bar{x}$	381	817	495	666	727	1117	330	595	389	280
s	187	394	368	523	390	1239	259	589	289	208
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Dysgammaglobulinämische Hühner										
3195	696	1358	537	852	49	98	397	529	189	230
3218	2320	2098	834	3128	2262	2095	1158	1659	290	66
3219	34	575	943	638	651	587	279	1091	130	78
3224	0	410	159	1577	487	866	165	216	252	779
3236	288	318	174	406	399	540	477	139	85	55
3240	285	398	363	553	397	348	519	702	1117	4315
$\bar{x}$	604	860	502	1192	708	756	499	723	344	921
s	877	717	332	1034	787	704	348	574	386	1686
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Tab.8 IgM-Anti-DNP-Titer (Elisaeinheiten/ml) der Gruppe DNPI-Häm2 nach Immunisierung mit 0,5 mg/kg KG DNP-Häm am Tag 0. Jeweils 5 µg/kg KG LPS an den Tagen 42, 63 und 105.

Tierrrr.	Tage nach Immunisierung									
	0	8	14	21	42	49	56	63	105	112
Kontrollhühner										
656	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
657	0	4	1	0,5	0,4	0	0,8	0	0	0
658	0,4	2	4	1	4	0,8	0,8	0,7	0,3	0
659	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
663	0	0	1	0	0	0	1	4	0	0
665	0	0	0	0,3	1	0,3	1	0,9	0	0
$\bar{x}$	0	1	1	0,3	0,9	0,2	0,6	1	0	0
s	0,2	1,7	1,5	0,4	1,6	0,3	0,5	1,5	0,1	0
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Dysgammaglobulinämische Hühner										
3195	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3218	0	1	29	2	13	4	3	5	5	5
3219	4	2	0,7	1	13	9	15	26	7	0,6
3224	0,3	3	6	4	17	0,9	1	1	0,3	0,7
3236	1	1	4	8	13	3	3	11	5	2
3240	3	2	10	9	2	21	4	17	13	8
$\bar{x}$	3	2	8	4	10	8	4	10	5	4
s	4	1	11	4	7	7	5	10	5	3
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Tab.9 IgA-Anti-DNP-Titer (Elisaeinheiten/ml) der Gruppe DNPI-Häm2 nach Immunisierung mit 0,5 mg/kg KG DNP-Häm am Tag 0. Jeweils 5 µg/kg KG LPS an den Tagen 42, 63 und 105.

Tiernr.	Tage nach Immunisierung				
	-7	0	8	14	21
Kontrollhühner					
266	411	1047	41138	13045	2960
267	1338	279	11109	57727	60199
268	145	163	42018	9453	8043
270	246	248	1332	940	206
293	8	954	5623	65333	49297
294	0	0	50	100	88
$\bar{x}$	358	449	16878	24433	20132
s	504	439	19521	29255	27187
n	6	6	6	6	6
Dysgammaglobulinämische Hühner					
3070	0	0	52398	48455	31369
3095	0	0	11750	6775	46273
3099	0	0	3572	5554	3415
3100	0	0	0	0	0
3104	0	0	219	0	0
3112	0	0	29695	1934	1282
$\bar{x}$	0	0	16272	10453	13723
s	0	0	20926	18830	20043
n	6	6	6	6	6

Tab.10 IgG-Anti-DNP-Titer (Elisaeinheiten/ml) der Gruppe DNPII-HSA nach Vorimmunisierung mit 0,4 µg/kg KG HSA am Tag -7 und Immunisierung mit 20mg/kg KG DNP-HSA am Tag 0.

Tiernr.	Tage nach Immunisierung				
	- 7	0	8	14	21
Kontrollhühner					
266	787	671	1447	1331	774
267	286	538	1375	1304	955
268	290	140	1170	7624	826
270	5230	2417	5382	2707	647
293	282	259	1103	1001	463
294	4206	10241	12327	1929	584
$\bar{x}$	1847	2378	3801	2649	708
s	2256	3940	4490	2511	178
n	6	6	6	6	6
Dysgammaglobulinämische Hühner					
3070	66	38	24	590	569
3095	147	1839	1968	1873	1313
3099	2140	587	511	474	23
3100	748	320	1476	832	209
3104	2379	1596	6238	442	412
3112	25	19	1774	275	168
$\bar{x}$	918	733	1999	748	449
s	1075	794	2209	581	465
n	6	6	6	6	6

Tab.11 IgM-Anti-DNP-Titer (Elisaeinheiten/ml) der Gruppe DNPII-HSA nach Vorimmunisierung mit 0,4 µg/kg KG HSA am Tag -7 und Immunisierung mit 20 mg/kg KG DNP-IIISA am Tag 0.

Tierrrr.	Tage nach Immunisierung				
	-7	0	8	14	21
Kontrollhühner					
266	17	36	32	60	9
267	23	6	85	28	10
268	1	0,1	27	7	0,4
270	11	72	45	35	27
293	1	2	51	4	2
294	9	337	21	66	107
$\bar{x}$	10	76	44	33	26
s	9	131	23	26	41
n	6	6	6	6	6
Dysgammaglobulinämische Hühner					
3070	3	2	97	228	43
3095	14	24	343	28	19
3099	1	1	21	26	15
3100	2	4	8	10	5
3104	108	52	131	94	140
3112	4	6	8	2	6
$\bar{x}$	22	15	101	65	38
s	42	20	129	86	52
n	6	6	6	6	6

Tab.12 IgA-Anti-DNP-Titer (Elisaeinheiten/ml) der Gruppe DNPII-HSA nach Vorimmunisierung mit 0,4 µg/kg KG HSA am Tag -7 und Immunisierung mit 20 mg/kg KG DNP-HSA am Tag 0.

Tierrnr.	Tage nach Immunisierung				
	- 7	0	8	14	21
Kontrollhühner					
000	96	614	4462	282	54
410	353	816	10764	1255	2231
411	403	281	1715	463	521
412	1287	546	1795	517	338
428	992	590	3551	423	343
430	1993	174	487	2010	685
$\bar{x}$	854	504	3796	825	695
s	712	235	3697	674	781
n	6	6	6	6	6
Dysgammaglobulinämische Hühner					
3181	0	0	0	0	0
3182	0	0	0	0	0
3184	0	0	0	0	0
3186	0	0	0	0	0
3187	0	0	0	0	0
3188	0	0	0	0	0
$\bar{x}$	0	0	0	0	0
s	0	0	0	0	0
n	6	6	6	6	6

TaB. 13 IgG-Anti-DNP-Titer (Elisaeinheiten/ml) der Gruppe DNP II-HämI nach Vorimmunisierung mit 0,4 ug/kg KG Häm am Tag -7 und Immunisierung mit 5 mg/kg KG DNP-Häm am Tag 0.

Tiernr.	Tage nach Immunisierung				
	- 7	0	8	14	21
Kontrollhühner					
000	0	0	0	0	0
410	72	115	227	195	156
411	869	72	378	172	42
412	411	317	721	389	710
428	118	339	1668	907	239
430	786	638	749	930	1015
- x	376	247	624	432	360
s	378	235	587	396	410
n	6	6	6	6	6
Dysgammaglobulinämische Hühner					
3181	1180	104	801	782	1169
3182	689	552	224	170	86
3184	591	251	695	264	200
3186	217	220	594	262	2286
3187	505	365	1108	338	685
3188	647	482	831	937	487
- x	638	329	709	459	819
s	314	169	294	319	815
n	6	6	6	6	6

Tab. 14 IgM-Anti-DNP-Titer (Elisaeinheiten/ml) der Gruppe DNPII-Häm1 nach Vorimmunisierung mit 0,4 µg/kg KG Häm am Tag -7 und Immunisierung mit 5 mg/kg KG DNP-Häm am Tag 0.

Tiernr.	Tage nach Immunisierung				
	- 7	0	8	14	21
Kontrollhühner					
000	3	0	0	0	0
410	4	1	4	1	1
411	0	0	1	2	0
412	6	3	1	3	2
428	17	10	17	23	14
430	3	1	0	2	5
$\bar{x}$	6	2	4	5	4
s	6	4	7	9	5
n	6	6	6	6	6
Dysgammaglobulinämische Hühner					
3181	5	0,6	0,8	0	0
3182	3	9	59	12	12
3184	1	0,5	3	5	2
3186	1	18	3	3	6
3187	1	3	3	4	2
3188	18	82	2	4	3
$\bar{x}$	5	19	12	5	4
s	7	32	23	4	4
n	6	6	6	6	6

Tab.15 IgA-Anti-DNP-Titer (Elisaeinheiten/ml) der Gruppe DNPII-Häm1 nach Vorimmunisierung mit 0,4 ug/kg KG Häm am Tag -7 und Immunisierung mit 5 mg/kg KG DNP-Häm am Tag 0.

Tiernr.	Tage nach Immunisierung				
	- 7	0	8	14	21
Kontrollhühner					
442	977	2583	2510	910	662
445	1475	361	417	2860	2421
446	0	0	0	0	0
448	2199	3851	1680	4175	846
449	1398	1694	2534	5738	8245
450	2179	5601	2134	249	1681
$\bar{x}$	1371	2348	1546	2322	2309
s	823	2135	1089	2327	3027
n	6	6	6	6	6
Dysgammaglobulinämische Hühner					
3193	0	0	0	0	0
3196	0	0	0	0	0
3204	0	0	0	0	0
3207	0	0	0	0	0
3209	107	91	1960	611	807
3212	0	0	47	32	0
$\bar{x}$	18	15	335	107	135
s	44	37	797	247	329
n	6	6	6	6	6

Tab.16 IgG-Anti-DNP-Titer (Elisaeinheiten/ml) der Gruppe DNPIL-Häm2 nach Vorimmunisierung mit 0,4 µg/kgKG Häm am Tag -7 und Immunisierung mit 0,5 mg/kgKG DNP-Häm am Tag 0.

Tiernr.	Tage nach Immunisierung				
	- 7	0	8	14	21
Kontrollhühner					
442	1233	1153	1066	644	1526
445	1041	628	756	634	520
446	3420	7414	4174	1605	2141
448	697	632	1046	518	862
449	975	1261	1303	706	712
450	563	266	274	402	1297
$\bar{x}$	1322	1892	1437	752	1176
s	1056	2730	1387	432	602
n	6	6	6	6	6
Dysgammaglobulinämische Hühner					
3193	861	1637	1468	100	230
3196	273	437	488	311	445
3204	557	557	696	384	264
3207	966	1085	1010	506	610
3209	168	199	1342	377	190
3212	0,8	2	5	488	44
$\bar{x}$	471	653	835	361	297
s	389	607	551	147	200
n	6	6	6	6	6

Tab. 17 IgM-Anti-DNP-Titer (Elisaeinheiten/ml) der Gruppe DNP11-Häm2 nach Vorimmunisierung mit 0,4 µg/kg KG Häm am Tag -7 und Immunisierung mit 0,5 mg/kg KG DNP-Häm am Tag 0.

Tierrrr.	Tage der Immunisierung				
	- 7	0	8	14	21
Kontrollhühner					
442	3	4	0,1	15	6
445	6	1	3	1	0,5
446	22	13	85	5	3
448	0,7	2	0,9	2	0,9
449	10	3	4	3	8
450	5	1	0,5	4	2
$\bar{x}$	8	4	16	5	3
s	8	5	34	5	3
n	6	6	6	6	6
Dysgammaglobulinämische Hühner					
3193	6	4	2	6	7
3196	3	3	3	1	0,8
3204	6	6	8	2	5
3207	2	27	5	3	2
3209	0,5	0,7	0,2	4	0,9
3212	4	5	8	0,2	6
$\bar{x}$	4	8	4	3	4
s	2	10	3	2	3
n	6	6	6	6	6

Tab.18 IgA-Anti-DNP-Titer (Elisaeinheiten/ml) der Gruppe DNPII-Häm2 nach Vorimmunisierung mit 0,4 ug/kg KG Häm am Tag -7 und Immunisierung mit 0,5 mg/kg KG DNP-Häm am Tag 0.

Tiernr.	Tage nach Immunisierung				
	- 7	0	8	14	21
Dysgammaglobulinämische Hühner Häm 1					
3281	0	0	0	0	0
3282	0	0	0	0	0
3283	0	0	0	0	0
3285	0	0	0	0	0
3288	0	0	0	0	0
3298	0	0	0	0	0
$\bar{x}$	0	0	0	0	0
s	0	0	0	0	0
n	6	6	6	6	6
Dysgammaglobulinämische Hühner Häm 2					
3289	0	0	0	0	0
3290	0	0	0	0	0
3292	0	0	0	0	0
3295	0	0	0	0	0
3296	0	0	0	0	0
3303	0	0	0	0	0
$\bar{x}$	0	0	0	0	0
s	0	0	0	0	0
n	6	6	6	6	6

Tab.19 IgG-Anti-DNP-Titer (Elisaeinheiten/ml) der Gruppen DNPIII-Häm1 und -Häm2 nach Vorimmunisierung mit 0,4 ug/kg KG Häm am Tag -7 und Immunisierung mit DNP-Häm und 0,25 mg/kg KG Levamisol am Tag 0.

Tiernr.	Tage nach Immunisierung				
	- 7	0	8	14	21
Dysgammaglobulinämische Hühner Häm 1					
3281	101	111	123	55	17
3282	774	495	444	2282	1723
3283	337	594	357	270	51
3285	133	141	75	84	108
3288	188	133	80	60	94
3298	65	120	83	86	110
$\bar{x}$	266	266	194	473	351
s	266	218	163	890	673
n	6	6	6	6	6
Dysgammaglobulinämische Hühner Häm 2					
3289	626	327	484	1742	399
3290	219	247	879	764	1588
3292	280	248	518	919	438
3295	150	395	1068	520	314
3296	149	40	49	82	72
3303	161	236	124	181	25
$\bar{x}$	264	249	520	701	473
s	184	120	402	604	572
n	6	6	6	6	6

Tab.20 IgM-Anti-DNP-Titer (Elisaeinheiten/ml) der Gruppen DNPIII-Häm1 und -Häm2 nach Vorimmunisierung mit 0,4 µg/kg KG Häm am Tag -7 und Immunisierung mit DNP-Häm und 0,25 mg/kg KG Levamisol am Tag 0.

Tiernrr.	Tage nach Immunisierung				
	- 7	0	8	14	21
Dysgammaglobulinämische Hühner Häm 1					
3281	1	0,7	1	7	2
3282	30	27	108	146	61
3283	12	3	2	4	1
3285	3	3	1	0,4	7
3288	0,3	1	1	1	2
3298	0,2	0,5	3	0,3	4
$\bar{x}$	8	6	19	26	13
s	12	10	43	59	27
n	6	6	6	6	6
Dysgammaglobulinämische Hühner Häm 2					
3289	3	2	2	11	10
3290	6	3	4	3	26
3292	5	3	6	3	17
3295	1	20	0,9	10	8
3296	7	3	0,7	2	3
3303	10	7	0,7	10	2
$\bar{x}$	5	6	2	7	11
s	3	7	2	4	9
n	6	6	6	6	6

Tab.21 IgA-Anti-DNP-Titer (Elisaeinheiten/ml) der Gruppen DNPIII-Häm1 und -Häm2 nach Vorimmunisierung mit 0,4 ug/kg KG Häm am Tag -7 und Immunisierung mit DNP-Häm und 0,25 mg/kg KG Levamisol am Tag 0.

Tierrart.	Tage nach Immunisierung				
	- 7	0	1	2	3
IgG Dysgammaaglobulinämische Hühner					
3284	0	0	0	0	0
3304	0	0	0	0	0
3305	0	0	0	0	0
3308	0	0	0	0	0
3316	0	0	0	0	0
3327	0	0	0	0	0
$\bar{x}$	0	0	0	0	0
s	0	0	0	0	0
n	6	6	6	6	6
IgM Dysgammaaglobulinämische Hühner					
3284	292	455	1486	1048	678
3304	35	6	52	33	45
3305	88	78	96	1013	861
3308	185	108	523	153	179
3316	276	155	138	132	75
3327	109	19	128	88	91
$\bar{x}$	164	137	404	411	322
s	105	165	557	482	355
n	6	6	6	6	6

Tab.22 IgG- und IgM-Anti-DNP-Titer (Elisaeinheiten/ml) der Gruppe DNPIII-HSA nach Vorimmunisierung mit 0,4 µg/kg KG HSA am Tag -7 und Immunisierung mit 20 mg/kg KG DNP-HSA und 0,25 mg/kg KG Levamisol am Tag 0.

Tiernr.	Tage nach Immunisierung				
	- 7	0	8	14	21
Dysgammaglobulinämische Hühner					
3284	12	36	9	3	2
3304	4	11	12	15	1
3305	10	18	15	13	37
3308	3	8	13	0,3	1
3316	4	3	4	2	18
3327	0,1	3	0,7	4	12
$\bar{x}$	6	13	9	6	12
s	5	13	6	6	14
n	6	6	6	6	6
$\bar{x}$					
s					
n					

Tab.23 IgA-Anti-DNP-Titer (Elisaeinheiten/ml) der Gruppe DNPIII-HSA nach Vorimmunisierung mit 0,4 ug/kg KG HSA am Tag -7 und Immunisierung mit 20 mg/kg KG DNP-HSA und 0,25 mg/kg KG Levamisol am Tag 0.

8. Literaturverzeichnis

1. ALDER, F.L. and L. CHI-TAN, 1971
Detection of morphine by haemagglutination-inhibition.
J.Immunol. 106, 1684-1685
2. ALDO-BENSON, M., L. SCHEIDERER and F.E. DWULET, 1986
2,4 - Dinitrophenyl (DNP) specific continuous B cell
lines as a model system for studying B cell activation
and tolerance.
Eur. J. Immunol. 16, 69-74
3. ALLISON, A.G. and A.J.S. DAVIES, 1971
Requirement of thymus - dependant lymphocytes for poten-
tiation by adjuvants of antibody formation.
Nature 233, 330-332
4. ANDERSSON, J., A. COUTINHO and F. MELCHERS, 1978
Stimulation of murine B lymphocytes to IgG synthesis and
secretion by the mitogens LPS and LP and its inhibition
by anti - immunoglobulin antibodies.
Eur. J. Immunol. 8, 336-343
5. ATWATER, J.S. and T.B. TOMASI Jr., 1978
Suppressor cells and IgA deficiency.
Clin. Immunol. and Immunopathol. 9, 379-384
6. BARRETT, J., A.J. AMMANN and S. STENMARK, 1980
IgG and IgM antibodies to pneumococcal polysaccharides
detected by ELISA.
Infection and Immunity 27, 411-417

7. BEARDS, G.M. and A.S. BRUYDEN, 1981
Evaluation of a new enzyme - linked immunosorbent assay
test for rotavirus antigen in faeces.
J. Clin. Path. 334, 1388-1391
8. BENEDICT, A.A., H.A. ABPLANALP, L.W. POLLARD and
L.Q. Tam, 1977
Inherited immunodeficiency in chickens: a model for
common variable hypogammaglobulinemia in man?
Adv. Exp. Med. Biol. 88, 197-204
9. BENEDICT, A.A., T.C. CHANH, L.Q. TAM, L.W. POLLARD, R.T.
KUBO and H.A. ABPLANALP, 1978
Inherited immunodeficiency in chickens. In animal models
of comparative and development aspects of immunity and
disease.
Pergamon Press, Oxford and New York
10. BOUT, D., J.C. DUGIMONT, H. FARAG and A. CAPRON, 1975
Le diagnostic immunoenzymologique des affections parasiti-
naires.
II. Immunoenzymologie quantitative.
Lille Med. 20, 561-566

11. BROOM, B.C., E.G. DE LA CONCHA, D.B. WEBSTER, G.L. JANOSSY and G.L. ASHERSON, 1976
Intracellular immunoglobulin production in vitro by lymphocytes from patients with hypogammaglobulinemia and their effect on normal lymphocytes.
Clin. exp. Immunol. 23, 73-77
12. CARLSSON, H.E., A.A. LINDBERG, S. HAMMARSTROM and A. Ljunggren, 1975
Quantitation of salmonella O - antibodies in human sera by enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA).
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 48, 485-494
13. CAULFIELD, M.J. and D. SHAFFER, 1984
A computer program for the evaluation of ELISA data obtained using an automated microtiter plate absorbance reader.
J. Immunol. Methods 74, 205-215
14. CHANH, E.L. and C. HENRY, 1976
Coexistence of helper and suppressor activities in carrier primed spleen cells.
J. Immunol. 117, 1132-1138
15. CHANH, T.C., A.A. BENEDICT, L.Q. TAM, H. ABPLANALP and M.E. GERSHWIN, 1980
Inherited 7S immunoglobulin deficiency in chickens: presence of suppressor T cells that suppress synthesis of 7S immunoglobulin but not IgM.
J. Immunol. 125, 108-114

16. CLAASEN, E., N. KORS and N. VAN ROOIGEN, 1986a
Influence of carriers on the development and localization of anti-trinitrophenyl antibody-forming cells in the murine spleen.
Eur. J. Immunol. 16, 271-276
17. CLAASEN, E., N. KORS and N. VAN ROOIGEN, 1986b
Influence of carriers on the development and localization of anti-trinitrophenyl antibody-forming cells in the murine spleen.
II. Suppressed antibody response to TNP-Ficoll after elimination of marginal zone cells.
Eur. J. Immunol. 16, 492-497
18. COLEMAN, J.W., J.M.K. YEUNG, M.D. TINGLE and B.K. PARK, 1986
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to protein-reactive drugs and metabolites: Criteria for identification of antibody activity. Detection and haptenspecificity of anti-DNP, anticaptopril and anti-sulphanilamidbenzoic acid.
J. Immunol. Methods 88, 337-44
19. COUTINHO, A., E. GRONOWISZ, W.W. BULLOCK and G. Möller, 1974
Mechanism of thymus-independant immunocyte triggering. Mitogenic activation of B cells result in specific immune responses.
J. Exp. Med. 139, 74-92

20. DANIEL, V. and V. LENHARD, 1986
Immunomodulation: Immunologische und therapeutische Aspekte.
Die gelben Hefte 16, 49-59

21. DEL GUERCIO, P., 1972
Effect of adjuvants on the antibody response to a hapten on a thymus-independent carrier.
Nature New Biol. 238, 213-215

22. EARDLEY, D.D. and E.E. SERCARZ, 1976
Modulation of help and suppression in a hapten-carrier system.
J. Immunol. 116, 600-605

23. EISEN, H.N., 1964
Preparation of purified anti-2,4-dinitrophenyl antibodies.
Meth. med. Res. 10, 94-102

24. ELSON, C.J. and R.B. TAYLOR, 1974
The suppressive effect of carrier priming on the response to a hapten-carrier conjugate.
Eur. J. Immunol. 4, 682-687

25. ENGVAL, E. and P. PERLMANN, 1971
Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G.
Immunochemistry 8, 871-874

26. ENGVALL, E. and P. PERLMANN, 1972
ELISA: Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes.
J. Immunol. 109, 129-135
27. ENGVALL, E. and P. PERLMANN, 1973
The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).
In: Automation in microbiology and immunology.
(Eds.: C.G. Heden and T. ILLENI)
Wiley and Sons, New York, pp. 527-542
28. ENGVALL, E. and H.E. CARLSSON, 1976
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).
In: First international symposium on immunoenzymatic techniques. Intern Symposium No. 2(Eds.: G. Feldman et al.)
North-Holland Publishing Co., Amsterdam, pp. 135-147
29. ERICKSON, K.L., M.E. GERSHWIN, H. ABPLANALP, R. IKEDA and A.A. BENEDICT, 1982
Inherited 7S immunoglobulin deficiency of chickens is associated with bursal degeneration anomalies.
Dev. Comp. Immunol. 6, 105-112
30. ESCHEN VON, K.B. and J.A. RUDBACH, 1981
Dissociation of the anti-hapten and anti-carrier responses of mice injected with dinitrophenylated lipopolysaccharide.
Infection and Immunity 31, 327-333

31. FIDLER, J.M., 1978
The induction of hapten-specific immunologic tolerance and immunity in the B lymphocytes.
III. In vitro evaluation of TNP specific tolerance and evidence for B cell deletion.
J. Immunol. 121, 245-254
32. FIEDLER, H., U. LÖSCH, D. HERLYN and G. HOFMANN-FEZER, 1977
Die Auswirkungen neonataler Cyclophosphamidverabreichung (Cy), chirurg. Bursektomie (Bx) und kombinierter Behandlung (Cy + Bx) auf die immunologische Leistungsfähigkeit von Küken in verschiedenen Altersstufen.
Zbl. Vet. Med. B 24, 609-622
33. FIEDLER, H., U. LÖSCH and K. HALA, 1980
Establishment of a B-compatible chickenline with normogammaglobulinemia and dysgammaglobulinemia.
Folia Biologica (Praha) 26, 17-25
34. FIEDLER, H., M. SCHEU, I. KÜHLMANN-RABENS and U. LÖSCH, 1981
Kinetics of delayed - type hypersensitivity (DTH) reactions and IgG - levels in FCA - injected dysgammaglobulinemic Bl2 chickens.
Immunobiol. 158, 293-302
35. GOLDSTEIN, G., 1978
Mode of action of levamisole.
J. Rheumatol. 5, 143-148

36. GRANFORS, K., 1979
Measurement of immunoglobulin M (Ig M), IgG, IgA antibodies against *Yersinia enterocolitica* by enzyme-linked immunosorbent assay persistence of serum antibodies during disease.
J. Clin. Microbiol. 9, 336-341
37. HAIMOVICH, J., E. HURWITZ, N. NOVIK AND M. SELA, 1970
Use of protein - bacteriophage conjugates for detection and quantitation of proteins.
Biochimica et Biophysica Acta 207, 125-129
38. HOVI, T., J. SUNI, L. HORTLING and A. VAHERI, 1978
Stimulation of chicken lymphocytes by T- and B-cell-mitogens.
Cell. Immunol. 39, 70-78
39. HUCHET, R. and D. GRANDJON, 1985
Hapten-specific unresponsiveness in mice.
III. Study of the B-cell functions of tolerant mice.
Scand. J. Immunol. 21, 337-343
40. IZUI, S., R.A. EISENBERG and F.J. DIXON, 1981
Subclass-restricted IgG polyclonal antibody production in mice injected with Lipid A - rich lipopolysaccharides.
J. Exp. Med. 153, 324-338

41. JORMALAINEN, S. and O. MÄKELÄ, 1971
Anti - hapten antibodies in normal sera.
Eur. J. Immunol. 1, 471-478
42. KATO, K., Y. HAMAGUCHI, H. FUKUI and E. ISHIWAKA, 1975
Enzyme - linked immunoassay. A simple method for synthesis of the rabbit antibody-beta-D-galactosidase complex and its general applicability.
J. Biochem. 78, 423-425
43. KATZ, D.H., W.E. PAUL, E.A. GOIDL and B. BENACERRAF, 1970
Carrier function in antihapten immune responses.
II. Enhancement of primary and secondary antihapten antibody responses by carrier preimmunization.
J. Exp. Med. 132, 261-281
44. KENNETH, W., G. HUNTER and D. LENZ, 1982a
Detection and quantification of the organophosphate insecticide paraoxon by competitive inhibition enzyme-immunoassay.
Life Sciences 30, 355-361
45. KENNETH, W., G. HUNTER, D.E. LENZ, A. BRIMFIELD and J. NAYLOR, 1982b
Quantification of the organophosphorus nerve agent soman by competitive inhibition enzyme immunoassay using monoclonal antibody.
FEBS LETTERS 149, 147-151

46. KLAUS, G.G.B., 1976
B cell tolerance induced by polymeric antigens.
IV. Antigen-mediated inhibition of antibody forming cells.
Eur. J. Immunol. 6, 200-207
47. KLINMAN, N.R., A.F. SCHRATER and D.H. KATZ, 1981
Immature B cells as the target for in vivo tolerance induction.
J. Immunol. 126, 1970-1973
48. KLUMPNER, W., 1980
Verlaufsuntersuchungen über die postnatalen Immunglobulinkonzentrationen im Serum normo- und dysgammaglobulinämischer Bl2 Hühner.
Dissertation, München
49. KÜHLMANN-RABENS, I., R. WANKE, F. STORANDT, B. ALTMANN, U. LÖSCH and M. MERKENSCHLAGER, 1986
Attempts to localize the defect in dysgammaglobulinemia of UM-B19 chickens by studying the effect of immunomodulating substances on immunoglobulin and antibody production.
Vet. Immunol. Pathol. in press
50. KUNIN, S., G.M. SHEARRER, S. SEGAL, A. GLOBERSON and M. FELDMANN, 1970
A bicellular mechanism in the immune response to chemically defined antigens.
III. Interaction of thymus and bone marrow-derived cells.
Cellular Immunology 2, 229-238

51. LANDSTEINER, K., 1945
The specificity of serological reactions.
Harvard University Press, Cambridge, Mass.
52. LAURELL, C.B., 1966
Quantitative estimation of proteins by electrophoresis
in agarose gel containing antibodies.
Anal. Biochem. 15, 45-52
53. LEHTONEN, O.P. and M.K. VILJANEN, 1980
Antigen density in ELISA; effect on avidity dependency.
J. Immunol. Meth. 36, 63-70
54. LEUTE, R., E.F. ULLMANN and A. GOLDSTEIN, 1972
Spin immunoassay of opiates and narcotics in urine and
saliva.
J. of the American Medical Association 221, 1231-1234
55. LIU, M.T., B.P. RAM, L.P. HART and J.J. PESTKE, 1985
Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the
mycotoxin Zearalenone.
Applied and Environmental Microbiology 50, 332-336
56. LÖSCH, U. and G. HOFFMANN_FEZER, 1973
Vergleichende histologische und immunologische Unter-
suchungen an immunologisch defekten Hühnern.
Zbl. Vet. Med. 20, 596-605
57. LÖSCH, U., R. WANKE und M. MERKENSCHLAGER, 1982
Antikörper - Isotypen nach Immunisierung genuin dysgam-
maglobulinämischer UM - B19 Hühner.
Zbl. Vet. Med. 29, 365-374

58. LOUIS, J.A. and P.-H. Lambert, 1980
Lipopolysaccharides: From immunostimulation to auto-immunity.
In: Immunostimulation (Eds.: L. Chedid, P.A. Miescher and H.J. Müller-Eberhard)
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 59-64
59. LOWE, C.R. and P.D.G. DEAN, 1974
The principles of affinity chromatography.
In: Affinity chromatography
Wiley and Sons, London, pp. 12-89
60. MALVANO, R., A. BONILO, M. DOVIS and M. ZANNINO, 1982
ELISA for antibody measurement. Aspects related to data expression.
J. Immunol. Meth. 48, 51-60
61. MIEDEMA, K., J. BOELHOUWER and J.W. OTTEN, 1972
Determinations of proteins and hormones in serum by an immunoassay using antigen - enzyme conjugates.
Clin. Chim. Acta 40, 187-192
62. MILLER, S.D. and N. CLAMAN, 1976
The induction of hapten-specific T cell tolerance by using hapten-modified lymphoid cells.
I. Characteristics of tolerance induction.
J. Immunol. 117, 1519-1526
63. MITCHISON, N.A., 1971a
The carrier effect in the secondary response to hapten-protein conjugates.
1. Measurement of the effect with transferred cells and objections to the local environment hypothesis.
Eur. J. Immunol. 1, 10-17

64. MITCHISON, N.A., 1971b
The carrier effect in the secondary response to hapten-protein conjugates.
Eur. J. Immunol. 1, 18-27
65. MOODY, C.E., J.B. INNES, G.W. SISKIND and M.E. WEKSLER, 1978
Tolerance induced by TNP-derivatized syngeneic erythrocytes: evidence for cooperation between hapten-specific T and hapten-specific B lymphocytes in the immune response.
J. Immunol. 120, 844-849
66. MULCAHY, G. and J. QUINN, 1986
A review of immunomodulators and their application in veterinary medicine.
J. Vet. Pharmacol. Therap. 9, 119-139
67. NOSSAL, G.J.V. and B.L. PIKE, 1978
Mechanismus of clonal abortion tolerogenesis.
I. Response of immature hapten specific B-lymphocytes.
J. Exp. Med. 148, 1161-1170
68. OKUMARA, K. and T. TADA, 1973
Suppression of hapten-specific antibody response by carrier-specific T-cells.
Nature 245, 180-182
69. ORLANS, E., 1968
Fowl antibody.
X. The purification and properties of an antibody to the 2,4-Dinitrophenyl groups.
Immunology 14, 61-67

70. O'SULLIVAN, M.J., J. BRIDGES and V. MARKS, 1979
Enzyme immunoassay: a review.
Biochemistry 16, 221-240
71. PAUL, W.E., D.H. KATZ, E.A. GOIDL and B. BENACERRAF, 1970
Carrier function in anti-hapten immune response.
II. Specific properties of carrier cells capable of enhancing anti-hapten antibody responses.
J. Exp. Med. 132, 281-297
72. PETERFY, F., P. KUUSELA and O. MÄKELÄ, 1983
Requirements for antibody assays mapped by monoclonal antibodies.
J. Immunol. 130, 1809-1813
73. PETERS, H., M.P. DIERICH and K. DOSE, 1982
Enzyme linked immunosorbent assay for detection of T-2 Toxin.
Hoppe-Seyler's Physiol. Chem. 363, 1437-1441
74. RAJEWSKY, K., V. SCHIRRMACHER, S. NASE and N.K. JERNE, 1969
The requirement of more than one antigenic determinant for immunogenicity.
J. Exp. Med. 129, 1131-1143
75. RENOUX, G. and M. RENOUX, 1977
Thymus-like activities on T-cell differentiation.
J. Exp. Med. 145, 466-471

76. RUITENBERG, E.J., P.A. STEERENBERG, B.J. BROSI and J. BUYS, 1974
Serodiagnosis of *Trichinella spiralis* infections in pigs by enzyme-linked immunosorbent assays.
Bull. W.H.O. 51, 108-109
77. SACHS, L., 1976
Statistische Methoden.
Springer Verlag, Berlin-heidelberg-New York
78. SARVAS, H., O. MÄKELÄ, P. TOIVANEN and A. TOIVANEN, 1974
Effect of carrier preimmunization on the anti-hapten response in the chicken.
Scand. J. Immunol. 3, 455-460
79. SCHMITZ, H., U. VON DEIMLING and B. FLEHMIG, 1980
Detection of IgM antibodies to cytomegalovirus (CMV) using an enzyme-labelled antigen (ELA).
J. Gen. Virol. 50, 59-68
80. SCHRANNER, I., U. LÖSCH und M. MERKENSCHLAGER, 1982
Das Serumproteinmuster des Haushuhns. Vergleichende Darstellung der Serumproteine normaler und defekter Hühner.
Zbl. Vet. Med. A 29, 327-336
81. SCHRANNER, I. and U. LÖSCH, 1986
Immunological identification of avian monomeric and polymeric IgM and IgA after fractionation on SDS pore gradient polyacrylamide gels.
Poultry Science 65, 360-368

82. SCHROEDER, H.R., P.O. VOGELHUT, R.J. CARRICO,
R.C. BOGULASKI and R.T. BUCKLER, 1976
Competitive protein binding assay for biotin monitored
by chemiluminescence.
Analytical Chemistry 48, 1933-1937
83. SCHUURS, A.H.W.M. and B.K. VAN WEEMEN, 1977
Enzyme - Immunoassay.
Cli. Chim. Acta 81, 1-40
84. SCHWARTZ, S.A., Y.S. CHOI, L. SHOU and R.A. GOOD, 1977
Modulatory effects on immunoglobulin synthesis and se-
cretion by lymphocytes from immunodeficient patients.
J. Clin. Invest. 59, 1176-1187
85. SEGAL, S., A. GLOBERSON and M. FELDMANN, 1971a
A bicellular mechanism in the immune response to chemi-
cally defined antigens.
Cellular Immunology 2, 205-221
86. SEGAL, S., A. GLOBERSON and M. FELDMANN, 1971b
A bicellular mechanism in the immune response to chemi-
cally defined antigens.
II. Immunological Tolerance.
Cellular Immunology 2, 222-228
87. SHAW, E.J., R.A.A. WATSON and D.S. SMITH, 1977
Fluorimmunoassay of serum gentamicin.
Europ. J. of Drug Metabolism and Pharmacokinetics 4,
191-193

88. SIEGAL, F.P., M. SIEGAL and R.A. GOOD, 1976
Suppression of B cell differentiation by leukocytes from hypogammaglobulinemic patients.
J. Clin. Invest. 58, 109-122
89. SIMOENS, J., M. ROSENTHAL, M. DE BRABANDER and G. GOLDSTEIN, 1979
Immunoregulation with levamisole.
Springer Semin. Immunopathol. 2, 49-68
90. SNIPPE, H. and E. KAMP, 1975
Cell co-operation and hapten-carrier complexes.
Immunology 29, 675-685
91. SYMONS, D.B.A., C.A. CLARKSON and R.M. BINUS, 1983
Antibody response to dinitrophenyl hapten by foetal, neonatal and young pigs.
Immunology 48, 703-711
92. TAM, L.Q. and A.A. BENEDICT, 1975
Elevated 7S immunoglobulin and acute phase proteins in adjuvant-injected chickens.
Society for Exp. Biology and Med. 150, 340-346
93. WALDMANN, T.A., S. BRODER, R.M. BLAESE, M. DURM, M. BLACKMAN and W. STROBER, 1974
Role of suppressor T cells in pathogenesis of common variable hypogammaglobulinemia.

94. WALDMANN, T.A., S. BRODER, R. KRAKAUER, R.P. MC DERMOTT,
M. DURM, C. GOLDMAN and B. MEADE, 1976
The role of suppressor cells in the pathogenesis of
common variable hypogammaglobulinemia and the immunode-
ficiency associated with myeloma.
Fed. Proc. 35, 2076-2072
95. WEITS, J., G.C. DEBAST, T.H. THE, M.T. ESSELINK, A.M.
DEELDER, M. PETROVIC and E. MANDEMA, 1978
Class-specific antibody titres (ELISA) against the pri-
mary immunogen Helix pomatia haemocyanin in man.
Clin. Exp. Immunol. 32, 443-450
96. WISDOM, G.B., 1976
Enzyme-immunoassay.
Clin. Chem. 22, 1243-1255
97. VISONOFF, A., J.E. HOPPER and S.B. SPRING, 1975
The antibody molecule.
In: Immunology (Eds.: F.J. Dixon and H.G. Kunkel)
Immunology Academic Press, New York-San Francisco-London
98. VAN WEEMEN, B.K. and A.H.W.M. SCHUURS, 1971
Immunoassay using hapten-enzyme conjugates.
FEBS LETT. 15, 232-236

99. VAN WEEMEN, B.K. and A.H.W.M. SCHUURS, 1976
Sensitivity and specificity of hapten enzyme-immunoassays.
In: Immunoenzymatic Techniques (Eds.: G. Feldmann, P.
Druet, J. Bignon and S. Avrameas)
American-Elsevier Publishing Company, Inc.-New York, p
pp. 125-13
100. YALOW, R.S. and S.A. BERSON, 1959
Assay of plasma insulin in human subjects by immunologi-
cal methods.
Nature 184, 1648-1649

Herrn Prof. Dr. U. Lösch danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und seine freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Im besonderen danke ich Herrn Dr. P. Schmidt, der unermüdlich mit Rat und Tat zur Stelle war und eine wirklich vorbildliche Betreuung zeigte.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Labors für ihre stete Hilfsbereitschaft bei der praktischen Durchführung der Arbeit.

Für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz danke ich Herrn Prof. Dr. M. Merkenschlager und Herrn Prof. Dr. H. Zucker.

LEBENS LAUF

16.08.1958	geboren in Rheinfelden/Baden als Tochter von Erich und Margit Trüby, geb. Stadlwieser
1964 - 1968	Grundschule in Rheinfelden
1968 - 1977	Math.-nat. Gymnasium in Rheinfelden
03.05.1977	Allgemeine Hochschulreife
1978 - 1980	Studium der Agrarbiologie an der Universität Hohenheim in Stuttgart
1980 - 1981	Studium der Tiermedizin an der Justus-Liebig-Universität in Gießen
1981 - 1984	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
29.11.1984	Staatsexamen
25.05.1985	Approbation
ab März 1985	Anfertigung der vorliegenden Dissertation
August 1985 bis Januar 1986	Teilzeitbeschäftigte wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

